

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

*** NOTICES ***

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1]

The wound cladding material characterized by the content of endotoxin consisting of a cellular adhesiveness polypeptide (P) which are under 0.15EU/mg, and covering material (N) based on the weight of a cellular adhesiveness polypeptide (P).

[Claim 2]

The wound cladding material according to claim 1 whose covering material (N) is a difficulty biodegradability ingredient (N2).

[Claim 3]

The wound cladding material according to claim 1 or 2 whose cellular adhesiveness polypeptide (P) is a cellular adhesiveness artificial polypeptide (P2).

[Claim 4]

A cellular adhesiveness polypeptide (P) An Arg Gly Asp array, a Leu Asp Val array, An Arg Glu Asp Val array (1), a Tyr Ile Gly Ser Arg array (2), A Pro Asp Ser Gly Arg array (3), an Arg Tyr Val Val Leu Pro Arg array (4), A Leu Gly Thr Ile Pro Gly array (5), an Arg Asn Ile Ala Glu Ile Ile Lys Asp Ile array (6), An Ile Lys Val Ala Val array (7), a Leu Arg Glu array, An Asp Gly Glu Ala array (8), a Gly Val LysGly Asp Lys Gly Asn Pro Gly Trp Pro Gly Ala Pro array (9), A Gly Glu Phe Tyr Phe Asp Leu Arg Leu Lys Gly Asp Lys array (10), A wound cladding material given in any 1 term of claims 1-3 which come to contain at least one sort of minimum amino acid sequences (X) chosen from the group which consists of a His Ala Val array and a Tyr Lys Leu Asn Val Asn Asp Ser array (11).

[Claim 5]

A wound cladding material given in any 1 term of claims 1-4 which come to carry out the chemical bond of the cellular adhesiveness polypeptide (P) to covering material (N).

[Claim 6]

Furthermore, a wound cladding material given in any 1 term of claims 1-5 which come to contain a cell growth factor (G1) and/or a cell growth factor cementing material (G2).

[Claim 7]

A wound cladding material given in any 1 term of claims 1-6 which it comes to embellish with the compound (AM) with which a cellular adhesiveness polypeptide (P) contains the amino group or an ammonio radical.

[Claim 8]

A wound cladding material given in any 1 term of claims 1-7 to which a cellular adhesiveness polypeptide (P) comes to contain a heat-resistant amino acid sequence (Y) further.

[Claim 9]

The wound cladding material according to claim 8 whose heat-resistant amino acid sequences (Y) are a Gly Ala Gly Ala Gly Ser array (12) and/or a Gly Val Gly Val Pro array (13).

[Translation done.]

*** NOTICES ***

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[Field of the Invention]

[0001]

This invention relates to a wound cladding material. It is related with the wound cladding material which has a cellular adhesiveness polypeptide in more detail.

[Background of the Invention]

[0002]

Conventionally, the wound cladding material (patent reference 1) into which the collagen of the natural origin was processed a sheet and in the shape of sponge, the fibroblast content collagen sheet (patent reference 2) which cultivates the fibroblast of the skin origin on a collagen sheet or in a collagen sheet, and is obtained are known as a wound cladding material which has a cellular adhesiveness polypeptide.

[0003]

[Patent reference 1] JP,7-59812,A

[Patent reference 2] JP,9-47502,A

[Description of the Invention]

[Problem(s) to be Solved by the Invention]

[0004]

Since a main constituent was protein, there were problems, such as infection by the microorganism which has a bad influence on the body, the microorganism origin matter, etc. mixing into a wound cladding material, and it will collapse by the exudate from a wound and the gestalt of a wound cladding material will be lost, and the wound cladding material which has the conventional cellular adhesiveness polypeptide had the trouble of being unable to perform a stick substitute, when applying a wound cladding material to a wound side. That is, even if the purpose of this invention has very low mixing of the microorganism which has a bad influence on the body, the microorganism origin matter, etc. and has contact with an exudate etc., it is offering the wound cladding material with which the gestalt of a wound cladding material is maintained.

[Means for Solving the Problem]

[0005]

As a result of coming research in piles wholeheartedly, by using a specific peptide and specific covering material, this invention person found out attaining the above-mentioned purpose, and reached this invention. That is, the description of the wound cladding material of this invention makes a summary the point that the content of endotoxin consists of a cellular adhesiveness polypeptide (P) which are under 0.15EU/mg, and covering material (N) based on the weight of a cellular adhesiveness polypeptide (P).

[Effect of the Invention]

[0006]

The wound cladding material of this invention has very few endotoxin contents, and a cell can be pasted up very efficiently on a wound cladding material. Furthermore, if the wound cladding material of this invention is applied to a wound side, it will change into a very good playback condition, without a wound side infecting and conglutinating. Therefore, the wound cladding material of this invention has little danger of mixing, such as a microorganism and microorganism origin matter, and a stick substitute of a wound cladding material is easy for it, and it can promote recovery of a wound.

[Best Mode of Carrying Out the Invention]

[0007]

The cellular adhesiveness polypeptide (P) includes the minimum amino acid sequence (X) showing a cell adhesion signal. As the minimum amino acid sequence (X) showing a cell adhesion signal, what is indicated in "pathophysiology, volume [9th] No. 7, 527-535 pages, 1990", and "an Osaka prefectural mother-and-child medical center magazine, volume [8th] No. 1, 58-66 pages and 1992" is used, for example.

[0008]

In these minimum amino acid sequences (X), an Arg Gly Asp array, A Leu Asp Val array, an Arg Glu Asp Val

array (1), A Tyr Ile Gly Ser Arg array (2), a Pro Asp Ser Gly Arg array (3), An Arg Tyr Val Val Leu Pro Arg array (4), A Leu Gly Thr Ile Pro Gly array (5), an Arg Asn Ile Ala Glu Ile Ile Lys Asp Ile array (6), An Ile Lys Val Ala Val array (7), a Leu Arg Glu array, An Asp Gly Glu Ala array (8), a Gly Val Lys Gly Asp Lys Gly Asn Pro Gly Trp Pro Gly Ala Pro array (9), A Gly Glu Phe Tyr Phe Asp Leu Arg Leu Lys Gly Asp Lys array (10), A His Ala Val array and a Tyr Lys Leu Asn Val Asn Asp Ser array (11) are desirable. From a viewpoint of cellular adhesiveness, it is an Arg Gly Asp array, a Tyr Ile Gly Ser Arg array (2), and an Ile Lys Val Ala Val array (7) still more preferably, and is an Arg Gly Asp array especially preferably. in addition, an amino acid sequence — a three-character notation — expressing — () — the array number corresponding to an array table is indicated inside (it is the same hereafter.).

[0009]

Although a cellular adhesiveness polypeptide (P) should just have said minimum amino acid sequence (X) in [at least one] 1 molecule What it has in [two or more] 1 molecule from a viewpoint of cellular adhesiveness is desirable. What it has in [50 or less] 1 molecule is desirable, what it has three or more pieces is still more desirable, and especially the thing that it has five or more pieces is desirable, and especially the thing that it has 20 or less pieces is [what it has 30 or less pieces is still more desirable, and] desirable. Moreover, two or more sorts of arrays may be included in a monad.

[0010]

From a viewpoint of cellular adhesiveness, 3,000,000 or less are desirable still more desirable, and the number average molecular weight (Mn) of a cellular adhesiveness polypeptide (P) is 300,000 or less especially preferably 1,000,000 or less, and 300 or more are 3,000 or more especially preferably 1,000 or more desirable still more preferably. in addition, Mn of a cellular adhesiveness polypeptide (P) — SDS-PAGE (SDS polyacrylamide gel electrophoresis) — it is law, a cellular adhesiveness polypeptide (P) is separated, and it asks by comparing migration distance with the standard substance (it is the same hereafter.).

[0011]

As a cellular adhesiveness polypeptide (P), although a cellular adhesiveness natural polypeptide (P1), a cellular adhesiveness artificial polypeptide (P2), etc. can be used, a cellular adhesiveness artificial polypeptide (P2) is desirable at the point that the number of the minimum amino acid sequence (X) showing a cell adhesion signal and heat-resistant amino acid sequences (Y), arrangement, etc. can be designed freely, cellular adhesiveness is raised or sterilization by heat-treatment and decomposition of endotoxin can be made easy.

[0012]

As a cellular adhesiveness natural polypeptide (P1) the sugar protein (for example, a laminin and entactin (NAIDOJEN) —) which exists in basement membrane TENEISHIN, AGURIN, osteonectin, osteocalcin, osteopontin, FIBURIN, a fibrinogen, vitronectin, support phosphorus, BAMIN, a thrombospondin, etc., proteoglycan (BIGURIKAN for example, AGURIKAN and a pearl can —) Decorin, FIBUROMOJURIN, bar SHIKAN, DEYURIN, a neuro-can, BUREBIKAN, a roux mandarin orange, a cel glycine, Cindy Quan, CD44, beta glycan, TRON BOMODEYURIN, GURIPIKAN, SEREBURO glycan, NG2 proteoglycan, etc., The sugar proteins (for example, integrin, an integrin super family, cadherin, a cadherin super family, etc.) which exist in a cell membrane, the matter (for example, OKURU DIN etc.) about a tight junction, etc. are mentioned.

[0013]

As a cellular adhesiveness artificial polypeptide (P2) For example, the polypeptide which consists of a Tyr Ile Gly Ser Arg array (2), The polypeptide which consists of an Ile Lys Val Ala Val array (7), The polypeptide which consists of an Arg Gly Asp Ser array (14), The polypeptide which consists of a Gly Arg Gly Asp Ser array (15), The polypeptide which consists of a Gly Arg Gly Asp Ser Pro array (16), The polypeptide which consists of an Arg Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro array (17), The polypeptide which consists of an Ala Val ThrGly Arg Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ala array (18), The polypeptide which consists of a Pro Gly Ala Ser Ile Lys Val Ala Val Ser Ala Gly Pro Ser array (19), The polypeptide which consists of a Cys Ser Arg Ala Arg Lys Gln Ala Ala Ser Ile Lys Val Ala Val Ser Ala Asp Arg array (20), The polypeptide which consists of a Val Cys Glu Pro Gly Tyr Ile Gly Ser Arg Cys Asp array (21), the polymer which consists of these polypeptides of a kind of at least can be illustrated. Besides these, as a polymer, for example, the polymer which consists of four (Arg Gly Asp Ser) arrays (22), The polymer which consists of eight arrays (23), (Arg Gly Asp Ser) The polymer which consists of 16 arrays (24), (Arg Gly Asp Ser) The polymer which consists of eight arrays (25), (Gly Arg Gly Asp Ser) The polymer which consists of eight arrays (26), (Gly Arg Gly Asp Ser Pro) The polymer which consists of four arrays (27), (Arg Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro) The polymer which consists of four arrays (28), (Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ala) The polymer which consists of four arrays (29), (Pro Gly Ala Ser IleLys Val Ala Val Ser Ala Gly Pro Ser) The polymer which consists of four arrays (30), (Cys Ser Arg Ala Arg Lys Gln Ala Ala Ser Ile Lys Val Ala Val Ser Ala Asp Arg) Or the polymer which consists of four (Val Cys Glu Pro Gly Tyr Ile Gly Ser Arg Cys Asp) arrays (31) is mentioned. As for the polymerization degree (repeat unit number) of this polymer, two or more are desirable, three or more are still more desirable, and four especially or more are desirable, and 50 or less are desirable, 30 or less are still more desirable, 20 especially or less are desirable, and 16 or less are

the most desirable than the viewpoint of cellular adhesiveness.

[0014]

As for a cellular adhesiveness artificial polypeptide (P2), it is desirable to include heat-resistant amino acid sequences (Y) other than the minimum amino acid sequence (X) which expresses a cell adhesion signal further. As a heat-resistant amino acid sequence (Y), a Gly Ala Gly Ala Gly Ser array (12), A Gly Val Gly Val Pro array (13), a Gly Pro Pro array, A Gly Ala Gln Gly Pro Ala Gly Pro Gly array (32), A Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly Ser Gln Gly Ala Pro Gly Leu Gln array (33), A Gly Ala Pro Gly Thr Pro Gly Pro Gln Gly Leu Pro Gly Ser Pro array (34), A Gly Ala array, a Gly Ala Gly Ala Gly Tyr (35) array, A Gly Ala Gly Val Gly Tyr array (36), a Gly Ala Gly Tyr Gly Val array (37), An Asp Gly Gly 12 (Ala) Gly Gly Ala array (38), a Gly Val Pro Gly Val array (39), Gly and Ala, a Gly Gly Ala array, etc. are mentioned. If these heat-resistant amino acid sequences (Y) are included, the stability over heat will increase further and it will become easy to carry out heat sterilization of a cellular adhesiveness polypeptide or the cellular adhesiveness polypeptide content base material with an autoclave etc. Since the thermal resistance which was excellent among these thermal-resistance amino acid sequences (Y) is obtained, a Gly Ala Gly Ala Gly Ser array (12), a Gly Val Gly Val Pro array (13), and a Gly Pro Pro array are Gly Ala Gly Ala Gly Ser arrays (12) desirable still more preferably.

[0015]

As for a heat-resistant amino acid sequence (Y), it is desirable that congener or (Y) of a different kind has repeated in order to raise the stability over heat further. 2-100 pieces are desirable still more desirable, and 3-50 pieces, the polymerization degree (repeat unit number) of a heat-resistant amino acid sequence (Y) is 4-30 pieces especially preferably, and is 4-20 pieces most preferably.

When it includes a heat-resistant amino acid sequence (Y), although (Y) should just be contained in which location of a cellular adhesiveness artificial polypeptide (P2), as for (Y) and an amino acid sequence (X), it is desirable [Y] that the polymer of (Y) and (X) are located by turns from a viewpoint of the ease of taking of the beta turn structure of a cellular adhesiveness artificial polypeptide (P2).

[0016]

When a cellular adhesiveness artificial polypeptide (P2) comes to have a heat-resistant amino acid sequence (Y), the content of a heat-resistant amino acid sequence (Y) From a viewpoint of stability over heat, in 1 molecule of a cellular adhesiveness artificial polypeptide (P2) 1,000 or less things which ten or more things [30 or more] which it has three or more pieces have especially preferably, and have 10,000 or less pieces desirable still more preferably have 3,000 or less pieces preferably especially desirable still more preferably.

[0017]

The following polypeptide the cellular adhesiveness artificial polypeptide (P2) is indicated to be by a ***** 3-No. 502935 official report and Handbook of Biodegradable Polymers, Harwood Academic Publishers, and Amsterdam as a thing which comes to have a heat-resistant amino acid sequence (Y), for example is mentioned. Namely, Mn about 100,000 polypeptide which has nine (Gly Ala Gly Ala Gly Ser) arrays (40) and about 13 Arg Gly Asp arrays at a time, respectively (SLPF), Mn about 100,000 polypeptide which has nine arrays (40) and about 13 Tyr Ile Gly Ser Arg arrays (2) at a time, respectively, (Gly Ala Gly Ala Gly Ser) Mn about 100,000 polypeptide which has nine arrays (40) and about 13 Ile Lys Val Ala Val arrays (7) at a time, respectively, (Gly Ala Gly Ala Gly Ser) Mn about 100,000 polypeptide which has eight arrays (41), and about 12 12 (Gly Ala Gly Ala Gly Ser) arrays (42) and Arg Gly Asp arrays at a time, respectively, (Gly Val Gly Val Pro) And (Gly Ala Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly ProPro) Mn about 50,000 polypeptide etc. which has 2 (43) arrays and about six Arg Gly Asp arrays at a time, respectively is mentioned.

[0018]

As a cellular adhesiveness artificial polypeptide (P2) which comes to have a heat-resistant amino acid sequence (Y) above else, the polypeptide which has the structure the minimum amino acid sequence (X) shown in the following (1) - (3) and a heat-resistant amino acid sequence (Y) come to carry out a chemical bond by turns can be used.

(1) When the minimum amino acid sequence (X) is an Arg Gly Asp array (x1)

The polypeptide which has 5 of (x1), and 4 of a Ser Pro Ala Gly Gly3(Ala Gly Ala Gly Ser Gly) Ala Ser Thr Gly array (44) and (y1) (45), The polypeptide which has 10 of (x1), and 9 of (y1) (46), The polypeptide which has 15 of (x1), and 14 of (y1) (47), Four pieces and Ser Pro Ala 2 (Gly Val Pro Gly Val) Gly Gly3(Gly Ala Gly Ala Gly Ser) Ala Ser Thr Gly of (x1) Three of an array (48) and (y2) The polypeptide which has 8 of the polypeptide (49) which it has, and (x1), and 7 of (y2) (50), The polypeptide which has 12 of (x1), and 11 of (y2) (51), Five pieces and Ser Pro Ala Ala Ser Asp Gly Gly 12 (Ala) Gly Gly Ala AlaSer Thr Gly of (x1) The polypeptide which has four of an array (52) and (y3) (53), The polypeptide which has 10 of (x1), and 9 of (y3) (54), The polypeptide which has 15 of (x1), and 14 of (y3) (55), the polypeptide (58) which has 10 of the polypeptide (57) which has 5 of (x1), and 4 of 13 (Gly Ala) arrays (y4) (56), and (x1), and 9 of (y4) — and (x1) the polypeptide (59) which has 15 pieces and 14 of (y4).

[0019]

(2) When the minimum amino acid sequences (X) are a Tyr Ile Gly Ser Arg array (2) and (x2)

The polypeptide which has 5 of (x2), and 4 of a Ser Pro Ala Gly Gly3(Ala Gly Ala Gly Ser Gly) Ala Ser Thr Gly array (44) and (y1) (60), The polypeptide which has 10 of (x2), and 9 of (y1) (61), The polypeptide which has 15 of (x2), and 14 of (y1) (62), Four pieces and Ser Pro Ala 2 (Gly Val Pro Gly Val) Gly Gly3(Gly Ala Gly Ala Gly Ser) Ala Ser Thr Gly of (x2) Three of an array (48) and (y2) The polypeptide which has 8 of the polypeptide (63) which it has, and (x2), and 7 of (y2) (64), The polypeptide which has 12 of (x2), and 11 of (y2) (65), Five pieces and Ser Pro Ala Ala Ser Asp Gly Gly 12 (Ala) Gly Gly Ala AlaSer Thr Gly of (x2) The polypeptide which has four of an array (52) and (y3) (66), The polypeptide which has 10 of (x2), and 9 of (y3) (67), The polypeptide which has 15 of (x2), and 14 of (y3) (68), The polypeptide (70) which has 10 of the polypeptide (69) which has 5 of (x2), and 4 of 13 (Gly Ala) arrays (y4) (56), and (x2), and 9 of (y4), the polypeptide which has 15 of (x2), and 14 of (y4) (71).

[0020]

(3) When the minimum amino acid sequences (X) are an Ile Lys Val Ala Val array (7) and (x3)

The polypeptide which has 5 of (x3), and 4 of a Ser Pro Ala Gly Gly3(Ala Gly Ala Gly Ser Gly) Ala Ser Thr Gly array (44) and (y1) (72), The polypeptide which has 10 of (x3), and 9 of (y1) (73), The polypeptide which has 15 of (x3), and 14 of (y1) (74), Four pieces and Ser Pro Ala 2 (Gly Val Pro Gly Val) Gly Gly3(Gly Ala Gly Ala Gly Ser) Ala Ser Thr Gly of (x3) Three of an array (48) and (y2) The polypeptide which has 8 of the polypeptide (75) which it has, and (x3), and 7 of (y2) (76), The polypeptide which has 12 of (x3), and 11 of (y2) (77), Five pieces and Ser Pro Ala Ala Ser Asp Gly Gly 12 (Ala) Gly Gly Ala AlaSer Thr Gly of (x3) The polypeptide which has four of an array (52) and (y3) (78), The polypeptide which has 10 of (x3), and 9 of (y3) (79), The polypeptide which has 15 of (x3), and 14 of (y3) (80), the polypeptide (82) which has 10 of the polypeptide (81) which has 5 of (x3), and 4 of 13 (Gly Ala) arrays (y4) (21), and (x3), and 9 of (y4) — and (x3) the polypeptide (83) which has 15 pieces and 14 of (y4).

[0021]

As a cellular adhesiveness artificial polypeptide (P2) which can come to hand from a commercial scene The polypeptide which will consist of a RGDS[Arg Gly Asp Ser array (14), for example if a trade name is indicated, Mn 400 [about],] by the peptide lab company, the polypeptide that consists of a GRGDS[Gly Arg Gly Asp Ser array (15), It has respectively Mn 500 [about],] by the peptide lab company, a PURONE cutin F[Arg Gly Asp array, and nine (Gly Ala Gly Ala Gly Ser) arrays [about 13] (40). The polypeptide, Mn 100,000 [about] which are manufactured with transgenics Escherichia coli,] by Sanyo Chemical Industries, Ltd., the thing which the PURONE cutin F plus [PURONE cutin F was made to react with JIMERU aminoethyl chloride, and was made into water solubility, It has respectively a] [by Sanyo Chemical Industries, Ltd.], and PURONE cutin L[Ile Lys Val Ala Val array (7), and nine (Gly Ala Gly Ala Gly Ser) arrays [about 13] (40). The polypeptide manufactured with transgenics Escherichia coli, Mn 100,000 [about],] by Sanyo Chemical Industries, Ltd., etc. are mentioned.

[0022]

A cellular adhesiveness artificial polypeptide (P2) is manufactured artificially, and can be easily manufactured by organic synthesis methods (enzymatic process, a solid phase synthesis method, liquid phase synthesis method, etc.), gene recombination, etc. About an organic synthesis method, the biochemistry experiment lecture 1, the proteinic chemistry IV (July 1, 1981, edited by Japanese Biochemical Society, Tokyo Kagaku Dojin Issue) or the ***** experiment lecture 2, the approach indicated by proteinic chemistry (below) (May 20, Showa 62, edited by Japanese Biochemical Society, Tokyo Kagaku Dojin Issue) are applicable, for example. About gene recombination, the approach indicated by the ***** No. 502935 [three to] official report is applicable, for example. In addition, since the impurity of the recombination microorganism origin may be included when based on gene recombination, it is 95 % of the weight or more for the affinity purification using an anti-polypeptide antibody etc. to refine, and to carry out purity of a polypeptide to 80% of the weight or more especially preferably 90% of the weight or more desirable still more preferably. The viewpoint that the amino acid sequence of a cellular adhesiveness polypeptide can be designed and manufactured easily to gene recombination is [among these] desirable.

[0023]

As a cellular adhesiveness artificial polypeptide by the organic synthesis method For example, the polypeptide which consists of an Arg Gly Asp Ser array (14) (Mn 400 [about]), The polypeptide which consists of a Gly Arg Gly Asp Ser array (15) (Mn 500 [about]), The polypeptide which consists of a Gly Arg Gly Asp Ser Pro array (16) (Mn 600 [about]), Or polypeptides, such as a polypeptide (Mn 1000 [about]) which consists of an Arg Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro array (17), other polymers, etc. are used. The polymer which consists of four (Arg Gly Asp Ser) arrays (22) as the above-mentioned polymer, for example (Mn 1700 [about]), The polymer which consists of eight arrays (23) (Mn 3000 [about]), (Arg Gly Asp Ser) The polymer which consists of 16 arrays (24) (Mn 7000 [about]), (Arg Gly Asp Ser) The polymer which consists of 8 (25) (Mn 4000 [about]), (Gly Arg Gly Asp Ser) (Gly Arg Gly Asp Ser Pro) The polymer (Mn 5000 [about]) which consists of 8 (26), or the polymer (Mn 4000 [about]) which consists of 4 (Arg Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro) (27) is mentioned.

the polymerization degree (repeat unit number) of these polymers — 2-50 — desirable — further — desirable — 3-30 — especially — desirable — 4-20 — it is 4-16 most preferably.

[0024]

As a cellular adhesiveness artificial polypeptide by gene recombination For example, Mn about 100,000 polypeptide which has nine (Gly Ala Gly Ala Gly Ser) arrays (40) and about 13 Arg Gly Asp arrays at a time, respectively (SLPF), Mn about 100,000 polypeptide which has nine arrays (40) and about 13 Tyr Ile Gly Ser Arg arrays (2) at a time, respectively, (Gly Ala Gly Ala Gly Ser) Mn about 100,000 polypeptide which has nine arrays (40) and about 13 Ile Lys Val Ala Val arrays (7) at a time, respectively, (Gly Ala Gly Ala Gly Ser) Mn about 100,000 polypeptide which has eight arrays (41), and about 12 12 (Gly Ala Gly Ala Gly Ser) arrays (42) and Arg Gly Asp arrays at a time, respectively, (Gly Val Gly Val Pro) And (Gly Ala Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly ProPro) Mn about 50,000 polypeptide etc. which has 2 (43) arrays and about six Arg Gly Asp arrays at a time, respectively is mentioned.

[0025]

As for a cellular adhesiveness polypeptide (P), it is desirable that can hold many cells on a wound cladding material, and the recovery period is embellished with the compound (AM) containing the amino group and/or an ammonio radical from a viewpoint that it can be shortened more.

[0026]

As a compound (AM) containing the amino group and/or an ammonio radical, the 4th class ghosts of these etc. can be used for the polymer list of the halogenide, amino-group content monomer, and amino-group content monomer which have polyamine, amino alcohol, and an amino group.

As polyamine, the polyamine (carbon numbers 2-56) which has the at least one 1st class amino group or the 2nd class amino group is used, and aliphatic series polyamine, alicyclic polyamine, heterocycle type polyamine, aromatic series polyamine, etc. are used.

[0027]

as aliphatic series polyamine — alkylene diamine (ethylenediamine —) Propylenediamine, trimethylene diamine, a tetramethylenediamine, a hexamethylenediamine, etc., the polyalkylene polyamine (diethylenetriamine —) whose carbon numbers of an alkylene group are 2-6 Iminobis propylamine, triethylenetetramine, tetraethylenepentamine, pentaethylenhexamine, etc., and these alkyl (carbon numbers 1-18) substitution products (dimethylamino propylamine —) Diethylamino propylamine, dipropylamino propylamine, methylethylamino propylamine, trimethyl hexamethylenediamine, N, and N-diocetadecyl ethylenediamine, trio KUTADE sill ethylenediamine, methyliminobispropylamine, etc. — etc. — it is mentioned.

[0028]

As alicyclic polyamine, a 1, 3-diamino cyclohexane, 1, 3-screw (methylamino) cyclohexane, 1, 3-screw (dihydroxy amino) cyclohexane, isophorone diamine, menthonaphtene diamine and 4, and 4'-methylene JISHIKURO hexanediamine etc. is mentioned.

As heterocycle type polyamine, piperazine, N-methyl piperazine, N-aminoethyl piperazine and 1, and 4-diamino ethyl piperazine etc. is mentioned.

As aromatic series polyamine, a phenylenediamine, N, and N'-dimethyl phenylenediamine, N and N, - trimethyl phenylenediamine, diphenylmethane diamine and 2, 6-diamino pyridine, tolylenediamine, diethyl tolylenediamine, and N'4, 4'-screw (methylamino) diphenylmethane, 1-methyl-2-methylamino-4-aminobenzene, etc. are mentioned.

[0029]

As amino alcohol, the amino alcohol of carbon numbers 2-58 etc. is used. The alkanolamine [monoethanolamine of carbon numbers 2-10, diethanolamine, Triethanolamine, monoisopropanolamine, a mono-butanol amine, Triethanolamine, tripropanolamine, tributanolamine, N and N-screw (hydroxyethyl) ethylenediamine and N and N, N',], these alkyl (carbon numbers 1-18) substitution product [N,N-dimethylethanolamine, such as N'-tetrakis (hydroxyethyl) ethylenediamine, N,N-diethylethanolamine, N-ethyl diethanolamine, N-octadecyl diethanolamine, N, and N-diethyl - N', N'-screw (hydroxyethyl) ethylenediamine, N — N - dioctadecyl - N — ' — N — ' - a screw (hydroxyethyl) — ethylenediamine — and — N — N — N — ' - a trio — KUTADESHIRU - N — ' - hydroxyethyl — ethylenediamine — etc. —] — etc. — mentioning — having .

[0030]

As a halogenide which has an amino group, the halogens (chlorine, bromine, etc.) ghost of the alkylamine of carbon numbers 2-17 etc. is used, and aminoethyl chloride, N-methylamino pro PIRUKURORIDO, dimethylamino ethyl chloride, diethylamino ethyl chloride, a dibenzylamino ethyl bromide, dimethylaminopropyl bromide, diethylamino propyl chloride, dibenzylamino propyl chloride, etc. are mentioned.

[0031]

As an amino-group content monomer, the amino-group content vinyl compound of carbon numbers 5-21, ethyleneimine, the amino acid of carbon numbers 2-20, etc. are used.

As an amino-group content vinyl compound, amino-group content (meta) acrylate, amino-group content (meta)

acrylamide, an amino-group content aromatic series vinyl hydrocarbon, the amino-group content allyl compound ether, etc. are used. In addition, acrylamide (meta) means acrylamide and/or methacrylamide.

[0032]

As amino-group content (meta) acrylate Aminoethyl (meta) acrylate, N-methylamino ethyl (meta) acrylate, N and N-dimethylaminoethyl (meta) acrylate, N, and N-diethylamino propyl (meta) acrylate, N and N-dipropyl aminoethyl (meta) acrylate, N-benzyl-N-methylamino ethyl (meta) acrylate, N and N-dibenzyl aminoethyl (meta) acrylate, N, and N-dibenzyl aminopropyl (meta) acrylate, morpholino ethyl (meta) acrylate, N-methyl PIPECHIJINO ethyl (meta) acrylate, etc. are mentioned.

[0033]

As amino-group content (meta) acrylamide, aminoethyl acrylamide, N-methylamino propylure krill amide, N, and N-dimethylaminoethyl (meta) acrylamide, N, and N-diethylamino propyl (meta) acrylamide, N, and N-dipropyl aminoethyl (meta) acrylamide, N-benzyl-N-methylamino ethyl (meta) acrylamide, morpholino ethyl (meta) acrylamide, N-methyl PIPECHIJINO ethyl (meta) acrylamide, etc. are mentioned.

[0034]

As an amino-group content aromatic series vinyl hydrocarbon, aminoethyl styrene, N-methylamino ethyl styrene, N, and N-dimethylamino styrene, N, and N-dipropylamino styrene, N-benzyl-N-methylamino styrene, etc. are mentioned.

As the amino-group content allyl compound ether, aminoethyl allyl compound ether, N-methylamino ethyl allyl compound ether, N, and N-dimethylaminoethyl allyl compound ether and N, and N-diethylaminoethyl allyl compound ether etc. is mentioned.

[0035]

As amino acid, an arginine, a histidine, an isoleucine, a leucine, a methionine, a phenylalanine, threonine, a tryptophan, a tyrosin, a valine, an alanine, an asparagine, an aspartic acid, a glutamine, glutamic acid, a proline, a cysteine, a lysine, a serine, a glycine, 3-aminopropionic acid, 8-amino bitter taste tongue acid, 20-amino eicosanoic acid, etc. are mentioned.

[0036]

As a polymer of an amino-group content monomer, vinyl polymer, polyethyleneimine, a polypeptide (a cellular adhesiveness polypeptide (P) is not included.), etc. which consist of an amino-group content vinyl compound are mentioned. 500 or more weight average molecular weight of the polymer of an amino-group content monomer is 2,000 or more especially preferably 1,000 or more desirable still more preferably, and 1,000,000 or less are 500,000 or less especially preferably 800,000 or less desirable still more preferably. In addition, weight average molecular weight can be measured with gel permeation chromatography (GPC). In addition, as a reference material, the polystyrene standard (TOSOH make) of molecular weight 420-20,600,000 can be used, for example.

[0037]

As the 4th class ghosts of these, that which formed these amino groups into 4 class by the 4th class-ized agents (methyl chloride, ethyl chloride, benzyl chloride, dimethyl carbonic acid, a dimethyl sulfate, ethylene oxide, etc.) is mentioned.

[0038]

As an approach of embellishing with the compound (AM) containing the amino group and/or an ammonio radical For example, the approach to which the compound (AM) containing the amino group and/or an ammonio radical and the cellular adhesiveness polypeptide before qualification are made to react, The approach of making the cellular adhesiveness polypeptide before qualification carrying out physical adsorption of the compound (AM) containing the amino group and/or an ammonio radical to a list etc. is applicable. The approach The same chemical association and/or same physical adsorption as (1) - (3) can be used among the joint approaches of of the cellular adhesiveness polypeptide (P) and covering material (N) which are mentioned later, and the same is said also of desirable chemical association and/or desirable physical adsorption.

[0039]

100,000 or less [per cellular adhesiveness (polypeptide P) 1 molecule] are desirable still more desirable, and the average number (individual) of the amino group of the cellular adhesiveness polypeptide embellished with the compound (AM) containing the amino group and/or an ammonio radical is 1,000 or less especially preferably 10,000 or less, and 0.001 or more are 0.1 or more especially preferably 0.01 or more desirable still more preferably.

[0040]

the approach that the average number of the above-mentioned amino group is well-known — a quantum — it can do — as a well-known approach — for example, trinitro benzenesulfonic acid (TNBS) — law [the proteinic chemistry IV (the Tokyo Kagaku Dojin issue, 1981)] etc., all amine ***** [JIS K 7237-1986 and ASTM D2074-66 grade] by the hydrochloric acid and indicator titrimetric methods (bromphenol blue etc.), etc. are mentioned.

specifically, the number of the amino group changes the concentration per unit volume in the compound (AM)

containing the known amino group and/or a known ammonio radical — making — TNBS — it measures by law and a calibration curve (the number of the amino group and graph of an absorbance) is produced. moreover, the cellular adhesiveness polypeptide before qualification (P) — TNBS — by law, it measures and the obtained absorbance is converted into the number of the amino group using a calibration curve. the cellular adhesiveness polypeptide after embellishing in coincidence — TNBS — by law, it measures and the obtained absorbance is converted into the number of the amino group using a calibration curve. The difference of the number of the amino group before and behind these qualification is computed, and it considers as the average number of the amino group embellished with *(ing) by the molecularity of a cellular adhesiveness polypeptide (P) which used the value for measurement by the cellular adhesiveness polypeptide (P).

[0041]

The compound (AM) containing the amino group and/or an ammonio radical may be combined with covering material (N). As an approach of combining the compound (AM) containing the amino group and/or an ammonio radical with covering material (N) For example, the compound (AM) containing the amino group and/or an ammonio radical and the approach to which covering material (N) is made to react, The approach of making covering material (N) carrying out physical adsorption of the compound (AM) containing the amino group and/or an ammonio radical to a list etc. is applicable. The approach The chemical association and/or physical adsorption same among the joint approaches of of the cellular adhesiveness polypeptide (P) and covering material (N) which are mentioned later as (1) – (3) can be used, and the same is said also of desirable chemical association and/or desirable physical adsorption, and is said of the quantum approach.

[0042]

The average number (individual) of the amino group of the covering material (N) embellished with the compound (AM) containing the amino group and/or an ammonio radical Two or more [per unit area of the wound cladding material of this invention / 108 //cm] are desirable. It is two or more [1012 //cm] especially preferably, and two or less [1022 //cm] are two or less [1018 //cm] especially preferably two or less [1020 //cm] desirable still more preferably two or more [1010 //cm] still more preferably.

[0043]

Since a cellular adhesiveness polypeptide consists of amino acid as well as protein, it serves as a nutrient of a microorganism and tends to receive mixing of a microorganism. Moreover, in producing a cellular adhesiveness polypeptide by the transgenics microorganism, in order to refine and extract the cellular adhesiveness polypeptide accumulated into the microorganism, the microorganism origin matter is easy to be mixed in a cellular adhesiveness polypeptide. Therefore, it is necessary to manage severely the microorganism to a cellular adhesiveness polypeptide, and mixing of the microorganism origin matter, and to protect them from a wound ingredient (N). As an index of mixing of a microorganism or the microorganism origin matter, endotoxin is suitable at the point which is the harmful matter itself. Endotoxin is a toxin which carries out postmortem isolation from the bacteria which have toxicity in the fungus body constituent itself, and has the basic structure which glycoprotein and a lipid connected (2nd edition Yodosha CO., LTD. issue 2000 of gene engineering keyword book revision).

[0044]

Based on the weight of a cellular adhesiveness polypeptide (P), from a viewpoint of safety, less than 0.15 are desirable still more desirable, and the content (EU/mg) of the endotoxin in the cellular adhesiveness polypeptide (P) of this invention is less than 0.0015 especially preferably less than 0.015.

[0045]

As a measuring method of an endotoxin content, the corpuscle extract of a king crab reacts to endotoxin, and the Limulus test approach using solidifying etc. can be applied. As a reagent kit for Limulus tests which can come to hand easily from a commercial scene, if a trade name shows, RIMURUSU F single Test Wako (Wako Pure Chem industrial company make), RIMURUSU ES-2 single Test Wako (Wako Pure Chem industrial company make), etc. will be mentioned, for example. preparation of the specimen liquid used for a reagent kit — a cellular adhesiveness polypeptide — demineralization distilled water (sterile) and an endotoxinic test — it is carried out by dissolving in the water which endotoxins, such as service water or method water for injection of a station, do not contain. Moreover, as the standard substance, the endotoxin reference standard defined by the Japanese pharmacopoeia and the standard substance authorized with this endotoxin reference standard can be used.

[0046]

As a measuring method of an endotoxin content using a commercial Limulus test reagent kit For example, when the detection sensitivity of endotoxin uses the Limulus test reagent kit of 0.015 EU/mL, 0.2mL(s) of the specimen liquid (1 mg/mL) which dissolved in 1mL of service water are mixed with a LAL reagent. a 1mg test portion (cellular adhesiveness polypeptide) — an endotoxinic test — If the visual judgment of whether the gel of water-insoluble nature is formed is carried out and gel is formed, it can judge with an endotoxin content being 0.015 or more EU/mg, and if gel is not formed, it can judge with an endotoxin content being less than 0.015 EU/mg. Moreover, if it changes to a 1mg test portion and a 0.1mg test portion is used (specimen liquid of 0.1

mg/mL), the judgment of whether to contain 0.15 or more EU/mg or the following similarly can be performed. Moreover, it can judge whether it contains 0.0015 or more EU/mg or the following by using a 10mg test portion similarly (specimen liquid of 10 mg/mL).

[0047]

Since endotoxin is contained in a bacterial cell wall etc., endotoxin may be mixed in a cellular adhesiveness polypeptide, when the cellular adhesiveness polypeptide was manufactured by the gene recombination by bacteria, or when a cellular adhesiveness polypeptide is dealt with except a non-fairy ring boundary. In such a case, the combination of the heating methods to which deactivation of the endotoxin is carried out with heat using a column method, an autoclave, or a hot air sterilizer etc. which separates endotoxin, using an endotoxin adsorption affinity column, a gel filtration column, or the column for hydrophobic chromatographies as an approach of removing the endotoxin mixed in the cellular adhesiveness polypeptide, for example, and these approaches etc. is applicable. Sterilization actuation is simple and the heating method is [among these] sure. [of endotoxin] As heating temperature, 40 degrees C or more 60 degrees C or more are 80 degrees C or more especially preferably desirable still more preferably, and 500 degrees C or less 300 degrees C or less are 200 degrees C or less especially preferably desirable still more preferably. 1 seconds or more are desirable still more desirable, and heating time is 1 minutes or more especially preferably 10 seconds or more, and 5000 or less minutes is 100 or less minutes especially preferably 500 or less minutes desirable still more preferably. The approach of removing such endotoxins can be used for a cellular adhesiveness natural polypeptide (P1) and a cellular adhesiveness artificial polypeptide (P2).

[0048]

The ingredient (following and difficulty biodegradability ingredient (N2)) which can be easily distributed, dissolved or absorbed by neither culture medium nor the wound side can be used for the covering material (N) of this invention at the time of use by the ingredient (henceforth, ready biodegradability ingredient (N1)) which tends to be distributed, dissolved or absorbed by culture medium and the wound side at the time of use by the cell culture, and application to a wound side, and the cell culture, and application to a wound side. Moreover, it can also be used combining a ready biodegradability ingredient (N1) and a difficulty biodegradability ingredient (N2). When applying to a wound side among these ingredients, a stick substitute is easy and a difficulty biodegradability ingredient (N2) is desirable at the point which is easy to deal with it. In addition, the thing containing a toxic substance with the serious bad influence for the body cannot use covering material (N).

[0049]

As a ready biodegradability ingredient (N1), naturally-occurring polymers (N1A), synthetic macromolecule (N1B), an inorganic substance (N1C), etc. can be used.

As naturally-occurring polymers (N1A), a collagen, gelatin, glycosaminoglycan, hyaluronic acid, chondroitin sulfate, a keratan sulfate, dermatan sulfate, heparin, an elastin, a chitin, chitosan, a fibrin, an alginic acid, starch, a dextran, albumin, polyhydroxy butanoic acid, pectin, a pectic acid, galactan, a pullulan, agarose, a cellulose, gluten, a fibroin, etc. are mentioned, for example.

[0050]

Lactic-acid, leucine, glycolic-acid, epsilon-caprolactone, and dioxanone, as synthetic macromolecule (N1B), the synthetic polypeptide which does not include the minimum amino acid sequence (X) which expresses a cell adhesion signal to the polymer (polyglycolic acid) which becomes considering the monomer chosen from the group which consists of a malic acid, a lactide, and glycolide as an indispensable monomer (**), and a list is mentioned, for example.

[0051]

As an inorganic substance (N1C), a calcium carbonate, calcium phosphate, etc. are used, for example. Precipitated calcium carbonate, whiting, etc. are mentioned as a calcium carbonate. As calcium phosphate, the mixture of hydroxyapatite, TORIKARUSHIUMU phosphate, and these and other calcium phosphate (for example, mono-calcium hydrogen phosphate etc.) etc. is mentioned.

[0052]

Naturally-occurring polymers (N1A) and synthetic macromolecule (N1B) are the polymers (polyglycolic acid) which become considering synthetic macromolecule (N1B) and the monomer chosen from the group which consists of lactic-acid, leucine, glycolic-acid, epsilon-caprolactone, and dioxanone, a malic acid, a lactide, and glycolide especially preferably as an indispensable monomer (**) desirable still more preferably among these.

[0053]

As a difficulty biodegradability ingredient (N2), naturally-occurring polymers (N2A), synthetic macromolecule (N2B), an inorganic substance (N2C), etc. can be used. As naturally-occurring polymers (N2A), natural fibers (cotton, hair, hemp, silk, etc.) etc. are mentioned, for example.

[0054]

as synthetic macromolecule (N2B) — polyolefine (polyethylene —) olefine copolymers (an ethylene-vinyl acetate copolymer —), such as polypropylene and these denaturation objects An ethylene-ethyl (meta) acrylate

copolymer, an ethylene-methyl (meta) acrylate copolymer, an ethylene-(meta) acrylic-acid copolymer, etc., Polyurethane, polyester, polyacrylic acid, a polyamide, a polyvinyl chloride, A polyvinylidene chloride, polystyrene, a fluororesin, silicone resin, a cellulose and a chemical fiber (viscose rayon and cuprammonium rayon rayon —) polynosic, acetate, triacetate, polyethylene, polypropylene, a polyamide, polyester, the poly acrylic nitril, Vinyon, a polyvinyl chloride, vinylidene, polyurethane, etc. — etc. — it is used. In addition, acrylate (meta) means acrylate and/or methacrylate.

[0055]

As an inorganic substance (N2C), metals (gold, silver, platinum, titanium, nickel, etc.), ceramics (an alumina, a zirconia, aluminium nitride, etc.), etc. are used, for example.

among these — viewpoints, such as handling nature, to a difficulty biodegradability ingredient (N2) — desirable — further — desirable — naturally-occurring polymers (N2A) and synthetic macromolecule (N2B) — especially — desirable — polyolefine, polyurethane, polyester, and polyacrylic acid — it is polyurethane most preferably.

[0056]

Covering material (N) is chosen synthetically in consideration of flexibility, elasticity, moderate steam permeability, bacillus barrier nature, and sterilization nature. The degree of hardness of covering material (N) is the point that handling is easy, and 40 or more are 60 or more especially preferably 50 or more desirable still more preferably, and 100 or less are 80 or less especially preferably 90 or less desirable still more preferably. In addition, a degree of hardness is measured based on JIS K 6301-1995 and a 5.2 spring-loaded-type hardness test (A form). In order that the moisture vapor transmission (g/m², 24hr) of covering material (N) may keep the storage in the wound of an exudate moderate, 200 or more are 2000 or more especially preferably 400 or more desirable still more preferably, and 15000 or less are 7000 or less especially preferably 10000 or less desirable still more preferably. In addition, moisture vapor transmission is measured based on JIS Z 0208-1976 (degrees C [40], 90%RH).

[0057]

15 or more are desirable still more desirable than the viewpoint which promotes wound healing, and the contact angle (degree) over the water of the front face of covering material (N) is 50 or more especially preferably 30 or more, and 120 or less are 100 or less especially preferably 110 or less desirable still more preferably. In addition, the contact angle over the water of the front face of covering material (N) can be measured using a contact angle meter (for example, consonance interface science incorporated company make, CA-S150 mold) etc. as a Measuring condition — measurement ambient temperature: — 25**1-degree-C, measurement ambient atmosphere relative humidity:65**5%, and measuring object temperature: — it reads after [of a contact angle] 25**1 degree C, volume:1.8**2microL of a drop, dropping needle:18G of a drop, and reading:dropping 15 **1 second, and comes out. The calculation approach of a contact angle is computed from a degree type. (Contact angle) = $2 \tan^{-1} \{ (\text{height of the drop after dropping}) / (\text{radius of the drop after dropping}) \}$

[0058]

Although the adsorption treatment by blocking of the physical processing for producing irregularity on the chemical preparation for being able to carry out surface treatment of the contact angle over the water of the front face of covering material (N), and it being able to control covering material (N), for example, giving functional groups (a perfluoroalkyl radical, a polyoxyethylene radical, a carboxyl group, a carbonyl group, a hydroxyl group, amino group, etc.) and a front face, protein, etc. is mentioned, chemical preparation and adsorption treatment are chemical preparation desirable still more preferably among these.

[0059]

As chemical preparation, SG (Soil Guard) processing, SR (Soil Release) processing (a guide to macromolecule drugs, Takehiko Fujimoto editorial supervision, Sanyo Chemical Industries, Ltd. issue), silane coupling agent processing, ozonization, electron ray processing, oxidizer processing, plasma treatment, corona discharge treatment, GORO electrodischarge treatment, etc. can be used, for example. As physical processing, the approach of grinding a front face by the diamond file (DT-101N) etc. can be used, for example, and also it can be made the shape of surface type of a request at the time of molding of covering material (N). The approach of covering material (N) being immersed into a protein content solution, and, for example, making protein adsorbing as adsorption treatment etc. can be used. As protein, milk origin protein, such as blood serum origin protein, such as albumin, and casein, etc. is mentioned.

[0060]

Although there will be especially no limit as a configuration of covering material (N) if it can be used for the therapy of wounds (the bed sore, an ulcer, burn, etc.), for example, the shape of the shape of a sheet and yarn etc. is mentioned, and the shape of the point of the ease of dealing with it in application to a cell culture or a wound to a sheet is [among these] desirable. It is 500 micrometers or less most preferably 3mm or less especially preferably 1cm or less still preferably 5cm or less more preferably [5 micrometers or more 15 micrometers or more are 30 micrometers or more most preferably especially preferably still preferably / 1 micrometers or more / as thickness of a sheet more preferably, and].

[0061]

as a sheet-like gestalt — a film, form (sponge), a nonwoven fabric, and textile fabrics — it knits and cloth, gel, etc. are mentioned. A film and form are films desirable still more preferably among these.

Although the amount of eyes of a film (g/m²) does not have especially a limit, ten or more are 30 or more especially preferably 20 or more desirable still more preferably, and 150 or less are 75 or less especially preferably 100 or less desirable still more preferably. 15 or more are desirable still more desirable, and the consistency (kg/m³) of form is 60 or more especially preferably 40 or more, and 500 or less are 150 or less especially preferably 250 or less desirable still more preferably. Although the amount of eyes of a nonwoven fabric, textiles, and knitting (g/m²) does not have especially a limit, 20 or more are 50 or more especially preferably 30 or more desirable still more preferably, and 300 or less are 100 or less especially preferably 200 or less desirable still more preferably.

[0062]

In addition, in a film and form, you may have the detailed hole at the whole surface or a part. The magnitude of this hole has the desirable magnitude air and whose steam are extent which can be passed easily. As magnitude of this hole, 0.005 or more are 0.05 or more especially preferably 0.01 or more desirable still more preferably as a puncturing area (mm²) of a hole, and 25 or less are five or less especially preferably ten or less desirable still more preferably. Moreover, although a circular, ellipse form, triangle, square, polygon, and line top (slit) etc. is mentioned, as long as the configuration of this hole can keep moderate the storage in the wound of the exudate made into that purpose, it may use which configuration.

[0063]

In the wound cladding material of this invention, a cellular adhesiveness polypeptide (P) and covering material (N) are usually compound-ized by chemical bonds (ionic bond, hydrogen bond, covalent bond, etc.) and/or physical adsorption (adsorption by Van der Waals force). It is the point that a cellular adhesiveness polypeptide (P) and covering material (N) are combined firmly, and a chemical bond is covalent bond desirable still more preferably.

[0064]

As an approach of carrying out covalent bond of the covering material (N) to a cellular adhesiveness polypeptide (P) For example, the thing which has the 1st class amino group or the 2nd class amino group among (1) and (P) for example, an arginine, a histidine, an isoleucine, a leucine, and a methionine — A phenylalanine, threonine, a tryptophan, a thyrosin, a valine, An alanine, an asparagine, an aspartic acid, a glutamine, glutamic acid, A proline, a cysteine, a lysine, a serine, a glycine, an ornithine, a histidine, What has a carboxyl group among the cellular adhesiveness polypeptide which contains 3-aminopropionic acid, 8-amino octanoic acid, 20-amino eicosanoic acid, etc. as a configuration unit, and (N) for example, the synthetic polypeptide which does not include the minimum amino acid sequence (X) showing polyglycolic acid and a cell adhesion signal — Polyethylene or the denaturation object of polypropylene, an ethylene-(meta) acrylic-acid copolymer, Polyacrylic acid, a collagen, gelatin, glycosaminoglycan, hyaluronic acid, Chondroitin sulfate, dermatan sulfate, heparin, an elastin, a fibrin, what has the 1st class amino group or the 2nd class amino group among approach; (2) to which covering material, such as an alginic acid, albumin, pectin, a pectic acid, gluten, and a fibroin, is made to react, and (P), and the thing (for example, polyglycolic acid —) which has hydroxyl among (N) An ethylene-vinyl acetate copolymer, polyurethane, polyester, A cellulose, a chemical fiber, a collagen, gelatin, glycosaminoglycan, Hyaluronic acid, chondroitin sulfate, a keratan sulfate, dermatan sulfate, Heparin, an elastin, a chitin, chitosan, a fibrin, an alginic acid, Starch, a dextran, albumin, polyhydroxy butanoic acid, pectin, What has hydroxyl among approach; (3) to which covering material, such as a pectic acid, galactan, a pullulan, agarose, gluten, and a fibroin, is made to react, and (P) for example, an aspartic acid, glutamic acid, a serine, a threonine, and a thyrosin — What has a halogen atom among approach; (4) to which the cellular adhesiveness polypeptide which contains thyronine, a hydroxy pudding, etc. as a configuration unit, and the thing which has a carboxyl group among (N) are made to react, and (P) What has hydroxyl or a sulfhydryl group among (for example, the cellular adhesiveness polypeptide embellished with the halogenide which has an amino group), and (N) (For example, covering material which has the structure which transposed some or all of hydroxyl to the sulfhydryl group in addition to what has the above-mentioned hydroxyl) approach; made to react — and The approach to which what has a vinyl group among (5) and (P) (for example, cellular adhesiveness polypeptide embellished with the amino-group content monomer), and the thing which has the amino group, hydroxyl, or a carboxyl group among (N) are made to react is mentioned.

[0065]

These reactions can be performed by well-known approaches (for example, approach given in "the foundation of peptide synthesis, an experiment, October 5, Heisei 9, and the Maruzen Co., Ltd. issue" etc.). Specifically, it is as the following (1) - (6).

When making what has the 1st class amino group or the 2nd class amino group among (1) and (P), and the thing which has a carboxyl group among (N) react, After making the carboxyl group of (N) react with a carbodiimide compound beforehand and considering as an acyl iso urea (R'-N=C(OCOR)-NH-R' (part to which -OCOR

originates in (N)], Amide association can be made to be able to form in (N) and (P) can be made to introduce into it by adding what has the 1st class amino group or the 2nd class amino group among (P). As a carbodiimide compound, N and N'-dicyclohexylcarbodiimide, a 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride, etc. are mentioned, for example.

[0066]

When making what has the 1st class amino group or the 2nd class amino group among (2) and (P), and the thing which has hydroxyl among (N) react, The hydroxyl of (N) is made to react with a carbonyldiimidazole compound beforehand. After an imidazoline ring and R make imidazole derivative {R-Im and Im origin} at (N), they can make (P) able to form in (N) and can make N-C association introduce it into it by adding what has the 1st class amino group or the 2nd class amino group among (P). As a carbonyldiimidazole compound, N and N'-carbonyldiimidazole etc. is mentioned, for example.

[0067]

When making what has hydroxyl among (3) and (P), and the thing which has a carboxyl group among (N) react, after making the carboxyl group of (N) react with a carbodiimide compound beforehand and considering as an acyl iso urea, an ester bond can be made to be able to form in (N) and (P) can be made to introduce into it by adding what has hydroxyl among (P).

[0068]

When making what has a halogen atom among (4) and (P), and the thing which has hydroxyl or a sulfhydryl group among (N) react, ether linkage or thioether association can be made to be able to form in (N), and (P) can be made to introduce into it by mixing both under existence of an alkali compound or nonexistence. As an alkali compound, inorganic alkali compounds (a sodium hydroxide, a potassium hydroxide, lithium hydroxide, etc.), organic alkali compounds (a dimethylamino pyridine, ammonia, triethylamine, sodium methoxide, DBU (San Apro trademark), etc.), etc. are mentioned, for example.

[0069]

When making what has a vinyl group among (5) and (P), and the thing which has the amino group, hydroxyl, or a carboxyl group among (N) react, both can be mixed under existence of an alkali compound or nonexistence, and (P) can be made to introduce into (N) by carrying out Michael addition.

[0070]

The approach of supplying a cellular adhesiveness polypeptide (P) to covering material (N), supplying (P) and (N) to a solvent etc., for example as physical adsorption, ionic bond, and/or an approach of carrying out hydrogen bond, mixing, and producing etc. is mentioned. Although there is especially no limit as a solvent, a water solution, water, body fluid, etc. which carry out content of mineral salt, an organic-acid salt, amino acid, a vitamin, alcohol, a lipid and sugar, an acid, and/or the base 0.001 to 50% of the weight (preferably 0.01 – 10 % of the weight) can be used.

[0071]

As mineral salt, a halogenation metal salt, a sulfuric-acid metal salt, a phosphoric-acid metal salt, a nitric-acid metal salt, a carbonic acid metal salt, a fault halogen acid metal, etc. can be used, for example, a sodium chloride, a sodium sulfate, sodium phosphate, a calcium chloride, iron nitrate, potassium chloride, magnesium sulfate, a sodium carbonate, dibasic sodium phosphate, potassium phosphate, a phosphoric-acid hydrogen potassium, a copper sulfate, an iron sulfate, a lithium chloride, a sodium bromide, a lithium bromide, a sodium perchlorate, lithium perchlorate, etc. are mentioned.

As an organic-acid salt, sodium formate, sodium acetate, an acetic-acid lithium, the sodium tartrate, etc. are mentioned, for example.

[0072]

As amino acid, an arginine, a histidine, an isoleucine, a leucine, a methionine, a phenylalanine, threonine, a tryptophan, a thyrosin, a valine, an alanine, an asparagine, an aspartic acid, glutamic acid, a proline, a serine, a glycine, etc. are mentioned, for example.

As a vitamin, a choline, an inositol, nicotinamide, a glutamine, vitamin A, vitamin B12, vitamin C, etc. are mentioned, for example.

As alcohol, the alcohol of carbon numbers 1-4 etc. can be used, for example, a methanol, ethanol, isopropyl alcohol, a butanol, etc. are mentioned.

As a lipid and sugar, a lipid, a monosaccharide, 2 sugar, an oligosaccharide, aminosugar, acid sugar, etc. are mentioned, for example.

[0073]

As an acid, an inorganic acid, the organic acid of carbon numbers 1-6, etc. can be used, for example, a hydrochloric acid, phosphoric acid, an acetic acid, formic acid, a phenol, a sulfuric acid, etc. are mentioned.

As a base, an inorganic base, the organic base of carbon numbers 2-6, etc. can be used, for example, a sodium hydroxide, a potassium hydroxide, ammonia, triethylamine, etc. are mentioned.

As water, distilled water, ion exchange water, tap water, ion-exchange distilled water, etc. are mentioned.

As body fluid, blood, plasma, a blood serum, urine, etc. are mentioned.

It is the water solution with which water contains mineral salt, an acid, and/or a base desirable still more preferably in the water solution containing mineral salt, an acid, and/or a base, and a list in these solvents. [0074]

The content of the cellular adhesiveness polypeptide in the wound cladding material of this invention (P) Per unit area of a wound cladding material and two or more 0.1 ng/cm are more desirable than the viewpoint which raises cellular adhesiveness. Preferably especially two or more 1 ng/cm still more preferably Two or more 10 ng/cm, It is two or more 100 ng/cm most preferably, and two or less 100 mg/cm is two or less 100microg/cm most preferably two or less 1 mg/cm especially preferably two or less 10 mg/cm still more preferably.

Although especially the measuring method of the content of the cellular adhesiveness polypeptide per unit area (P) is not limited, immunoassay can be used, for example. The content of the cellular adhesiveness polypeptide per unit area (P) can be measured by cutting off a part of front face (for example, 1cmx1cm square configuration) of a wound cladding material, making what carried out the indicator of the enzyme (the following, enzyme labelled antibody 1) specifically react to the antibody combined with a cellular adhesiveness polypeptide (P), and measuring the amount of enzymes of this enzyme labelled antibody 1 that reacted.

An enzyme labelled antibody 1 carries out the chemical bond of an enzyme and the specific antibody, and can usually carry out a chemical bond by the well-known approach. For example, the approach of carrying out the chemical bond of enzymes (for example, a peroxidase, beta-D-galactosidase, alkaline phosphatase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, etc.) and the specific antibody by the glutaraldehyde method, the periodic acid method, the maleimide method, the pyridyl disulfide method, etc. is applicable (super-high sensitivity enzyme immunoassay, Eiji Ishikawa work, Japan Scientific Societies Press, Inc., 1993; the volumes enzyme immunoassay, Eiji Ishikawa translation, Tokyo Kagaku Dojin Co., Ltd., and 1989; and enzyme-labeled antibody techniques, and for Keiichi Watanabe, interdisciplinary plan incorporated company, 1992). Moreover, a specific antibody is an antibody specifically combined with a cellular adhesiveness polypeptide (P), and can be produced by the well-known approach. For example, the polyclonal antibody producing method, the monoclonal antibody producing method (the volumes enzyme immunoassay, Eiji Ishikawa translation, Tokyo Kagaku Dojin Co., Ltd., and 1989; and enzyme-labeled antibody techniques, and for Keiichi Watanabe, interdisciplinary plan incorporated company, 1992), etc. are applicable. In addition, the affinity constant to the cross reacting antigen of a specific antibody is so desirable that it is small, for example, when the affinity constant to the cellular adhesiveness polypeptide (P) of a specific antibody is set to 1, one or less is desirable still more desirable, and the affinity constant to a cross reacting antigen is 0.01 or less especially preferably 0.1 or less. These affinity constants can be obtained by the approach of a publication to enzyme immunoassay (an Eiji Ishikawa translation, Tokyo Kagaku Dojin Co., Ltd., 1989).

[0075]

The wound cladding material of this invention may perform sterilization processing if needed. As the sterilization approach, radappertization, ethylene oxide gas sterilization, plasma sterilization, gamma ray sterility, alcoholic sterilization, autoclave sterilization, dry sterilization, etc. are mentioned, for example. Autoclave sterilization and dry sterilization are [among these] desirable at a point with simple sterilization actuation.

As autoclave sterilization and heating temperature in the case of sterilizing by hot air, 40 degrees C or more 60 degrees C or more are 80 degrees C or more especially preferably desirable still more preferably, and 180 degrees C or less 160 degrees C or less are 140 degrees C or less especially preferably desirable still more preferably.

As autoclave sterilization and heating time in the case of sterilizing by hot air, 1 seconds or more are 1 minutes or more especially preferably 10 seconds or more desirable still more preferably, and 5000 or less minutes is 100 or less minutes especially preferably 500 or less minutes desirable still more preferably.

As tub internal pressure in the case of carrying out autoclave sterilization, 0.002 or more MPas are 0.05 or more MPas especially preferably 0.01 or more MPas desirable still more preferably, and 5 or less MPas are 0.2 or less MPas especially preferably 1 or less MPa desirable still more preferably.

[0076]

Since the wound cladding material of this invention promotes wound healing, it is desirable to make a cell growth factor (G1) and/or a cell growth factor cementing material (G2) contain.

The matter which promotes growth of a cell as a cell growth factor (G1) For example, a fibroblast growth factor, a transforming growth factor, an epidermal growth factor, A hepatocyte growth factor, a platelet derived growth factor, insulin like growth factor, a vascular endothelial cell growth factor, A nerve growth factor, a stem cell factor, the leukemia inhibitor, an osteogenesis factor, a heparin joint epidermal growth factor, A neurotrophic factor, a connective tissue growth factor, ANJIOPO ethyne, KONDOROMOJURIN, TENOMOJURIN, interferon, interleukin, a tumor necrosis factor, Bioactive polypeptides, such as a colony stimulating factor, ADORENAMOJURIN, and a natriuresis peptide, etc. are used (it indicates for example, to foundation method name-of-a-person Furuya university publication meeting issue "the tissue engineering edited by the Ueda

fruit" (1999)).

- A fibroblast growth factor, a transforming growth factor, an epidermal growth factor, a hepatocyte growth factor, a platelet derived growth factor, insulin like growth factor, a vascular endothelial cell growth factor, an osteogenesis factor, interleukin, and a tumor necrosis factor are a fibroblast growth factor, an epidermal growth factor, insulin like growth factor, a vascular endothelial cell growth factor, interleukin, and a tumor necrosis factor desirable still more preferably from a viewpoint that the range of a tissue cell applicable in these cell growth factors (G1) is wide, and a recovery period can be shortened more.

[0077]

As a cell growth factor cementing material (G2), it is the matter in which a cell growth factor and association by ionic bond etc. are possible, for example, heparin, a heparan sulfate, chondroitin sulfate, dermatan sulfate, a keratan sulfate, hyaluronic acid, gelatin, a collagen, polylactic acid, agarose, an alginic acid, etc. are used (it indicates to for example, foundation method name-of-a-person Furuya university publication meeting issue "the tissue engineering edited by the Ueda fruit" (1999), and Yodosha Issue "the structure of cell adhesion, and a disease" (1998)).

In addition, these alkali-metal salts (a lithium, a potassium, sodium, etc.), alkaline-earth-metal salts (magnesium, calcium, etc.), or ammonium salt is included in heparin, a heparan sulfate, chondroitin sulfate, dermatan sulfate, a keratan sulfate, hyaluronic acid, gelatin, a collagen, polylactic acid, or an alginic acid.

Heparin, a heparan sulfate, chondroitin sulfate, hyaluronic acid, and gelatin are heparin, hyaluronic acid, and gelatin desirable still more preferably from a viewpoint that the range of a tissue cell applicable in these cell growth factor cementing materials is wide, and a recovery period can be shortened more.

[0078]

A cell growth factor (G1) and/or a cell growth factor cementing material (G2) usually exist in the condition of having been combined with covering material (N). The association can use the same chemical bond and/or same physical adsorption as association of the above-mentioned cellular adhesiveness polypeptide (P) and covering material (N), and its same is said also of a desirable chemical bond and/or desirable physical adsorption.

[0079]

The cell growth factor in the wound cladding material of this invention (G1), and/or the content of a cell growth factor cementing material (G2) Per unit area of the wound cladding material of the viewpoint of compaction of a recovery period to this invention, Two or more 0.01 pg/cm desirable still more preferably Two or more 0.1 pg/cm, It is two or more 10 pg/cm most preferably, and two or less 100microg/cm is two or less 0.1microg/cm-most preferably two or less 1microg/cm especially preferably two or less 10microg/cm still more preferably two or more 1 pg/cm especially preferably. In addition, it is one or less most preferably ten or less especially preferably 100 or less still preferably [1000 or less] more preferably [are 0.01 or more most preferably 0.001 or more especially preferably 0.0001 or more still more preferably / when it contains a cell growth factor (G1) and cell growth factor cementing material (G2) / these content ratio (G1/G2) is / 0.00001 or more / desirable, and /, and].

Although especially the measuring method of the cell growth factor per unit area (G1) and/or the content of a cell growth factor cementing material (G2) is not limited, immunoassay can be used, for example. By making what carried out the indicator of the enzyme (the following, enzyme labelled antibody 2) react to the antibody which cuts off a part of front face (the 1cmx1cm shape of for example, a square) of a wound cladding material with and/or (G1) (G2), and is specifically combined, and measuring the amount of enzymes of this enzyme labelled antibody 2 that reacted, it is per unit area (G1), and and/or (G2) can measure a content. In addition, an enzyme labelled antibody 2 is producible like the above-mentioned enzyme labelled antibody 1.

[Example]

[0080]

Although an example is hung up over below and this invention is explained to it in more detail, this invention is not limited only to these examples.

<Example 1>

Preparation of a cellular adhesiveness polypeptide [P2-1]

According to the approach of given [in a ***** No. 502935 / three to / official report] in an example, it has respectively an Arg Gly Asp array and nine (Gly Ala Gly Ala Gly Ser) arrays [about 13] (40), peptide "SLPF" of number average molecular weight 100,000 [about] was manufactured with transgenics Escherichia coli, the column chromatography refined, and the cellular adhesiveness polypeptide [P2-0] was obtained. Furthermore, the cellular adhesiveness polypeptide [P2-1] was obtained by carrying out autoclave sterilization (120 degrees C, 20 minutes) of this [P2-0].

[0081]

Preparation of a difficulty biodegradability ingredient [N2]

6.67g of aquosity urethane (trade name: made in [Sanyo Chemical Industries, Ltd.] Parma Lynn UA200) and 3.33g of ion exchange water were mixed, and the urethane water solution was prepared. This urethane water

solution was thrown in on the polypropylene sheet (incorporated company medical agent make) with a 20cm [20cm by] x height of 1mm, and was left in the room temperature (about 25 degrees C). 24 hours after room temperature neglect, 120 degrees C dried in the fair wind dryer for 1 hour. The urethane film formed on the polypropylene sheet was exfoliated from the polypropylene sheet after desiccation, and the difficulty biodegradability ingredient [N2] was obtained.

[0082]

Preparation of a wound cladding material [S1]

1mg of a cellular adhesiveness polypeptide [P2-1] was dissolved in 1mL of a 4.5M lithium perchlorate water solution, it diluted with the phosphate buffer solution (following, PBS) of 0.02M and pH7.2 which contains 99.5% of sodium chloride at 0.85 % of the weight 20 times further, and P2-1 water solution (50microg/mL) was produced. 10cmx10cm of the 50mL(s) and the difficulty biodegradability ingredient [N2] of this P2-1 water solution was supplied to the glass petri dish, standing was carried out at 25 degrees C for 1 hour, and [P2-1] was made to stick to [N2]. Finally the ion exchange water of 100mL(s) washed [N2] to which [P2-1] stuck 5 times, it was made to dry in a 37-degree C fair wind dryer for 12 hours, and the wound cladding material [S1] was prepared. (Coating weight of P2-1 (content): 0.5microg/cm2)

[0083]

The coating weight (content) of the cellular adhesiveness polypeptide [P2-1] of a wound cladding material [S1] was measured in the following procedures.

(1) The known standard wound cladding material [H1] and the wound cladding material [S1] with strange coating weight were respectively cut off in the 1cmx1cm square configuration, the coating weight (content) of a cellular adhesiveness polypeptide [P2-1] supplied one sheet in 3mL(s) of PBS which contains cow serum albumin at 1 % of the weight, and it was immersed at the room temperature (25 degrees C) for 2 hours.

In addition, although preparation of a standard wound cladding material was performed like preparation of the above-mentioned wound cladding material [S1], coating weight condensed P2-1 water solution after a cellular adhesiveness polypeptide adhering, freeze-dried, found non-adhered cellular adhesiveness polypeptide weight, and found it by deducting non-adhered cellular adhesiveness polypeptide weight from the cellular adhesiveness polypeptide weight before adhesion.

[0084]

(2) Each wound cladding material was taken out, each one wound cladding material was thrown in in 2mL(s) of PBS which contains peroxidase-labeling anti-P2-1 antibody by 10microg/mL, and contains 1 % of the weight and Tween20 for cow serum albumin at 0.2 % of the weight, and it reacted at 37 degrees C for 2 hours. Each wound cladding material was washed 3 times after the reaction by 5mL(s) of PBS which contains Tween20 at 0.2 % of the weight.

In addition, preparation of peroxidase-labeling anti-P2-1 antibody the polyclonal antibody producing method (enzyme immunoassay and an Eiji Ishikawa translation —) According to Tokyo Kagaku Dojin Co., Ltd. and 1989, **** a cellular adhesiveness polypeptide [P2-1] to a rabbit, and anti-P2-1 antibody is obtained. By combining the anti-P2-1 antibody and peroxidase (Toyobo Co., Ltd. make) by the maleimide method (enzyme immunoassay, an Eiji Ishikawa translation, Tokyo Kagaku Dojin Co., Ltd., 1989), peroxidase-labeling anti-P2-1 antibody was obtained.

[0085]

(3) Each wound cladding material was taken out, each one wound cladding material was thrown in in the mixed liquor of 0.2mL(s) of the coloring liquid set (Sanyo Chemical Industries, Ltd. make) of the reagent only for OLYDAS(s), and 1.8mL(s) of ion exchange water, and it reacted at 37 degrees C for 1 hour. Spectrometry was carried out on the wavelength of 380nm after the reaction.

(4) The calibration curve was created using the absorbance of a standard wound cladding material [H1], and the coating weight of a wound cladding material [S1] was obtained from the calibration curve. Hereafter, the coating weight of a polypeptide was measured similarly.

[0086]

<Example 2>

Preparation of a wound cladding material [S2]

0.479g of a 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (sigma company make) was dissolved in the ion exchange water of 50mL(s), and the carbodiimide water solution was produced. 10cmx10cm of the 50mL(s) and the difficulty biodegradability ingredient [N2] of this carbodiimide water solution was supplied to the glass petri dish, and it put at 25 degrees C for 1 hour. Then, the ion exchange water of 100mL washed 5 times. Next, 50mL(s) of P2-1 water solution were supplied, standing was carried out at 25 degrees C for 1 hour, and [P2-1] was combined with [N2]. Finally the ion exchange water of 100mL(s) washed [N2] which [P2-1] combined 5 times, it was made to dry in a 37-degree C fair wind dryer for 12 hours, and the wound cladding material [S2] was prepared. (Coating weight of P2-1 (content): 1microg/cm2)

[0087]

<Example 3>

Preparation of a wound cladding material [S3]

0.479g of a 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (sigma company make) was dissolved in the ion exchange water of 50mL(s), and the carbodiimide water solution was produced. 10cmx10cm of the 50mL(s) and the difficulty biodegradability ingredient [N2] of this carbodiimide water solution was supplied to the glass petri dish, and it put at 25 degrees C for 1 hour. Then, the ion exchange water of 100mL washed 5 times. Next, 50mL(s) of P2-1 water solution were supplied, standing was carried out at 25 degrees C for 1 hour, and [P2-1] was combined with [N2]. Then, the ion exchange water of 100mL washed 5 times. Furthermore, cell growth factor content [water-solution GS 11] 50mL which contains the fibroblast growth factor (product made from BEKUTONDIKKINSON) [G1-1] which is a cell growth factor (G1) by 50 ng/mL was supplied, standing was carried out at 25 degrees C for 1 hour, and [G1-1] was combined with [N2]. Then, the ion exchange water of 100mL washed 5 times, and the wound cladding material [S3] was prepared. (Coating weight of P2-1: 1microg/cm2)

[0088]

<Example 4>

Preparation of a wound cladding material [S4]

The cell growth factor content water solution [GS12] which contains the interleukin 2 (product made from BEKUTONDIKKINSON) [G1-2] which is a cell growth factor (G1) by 5 ng/mL instead of the cell growth factor content water solution [GS11] of an example 3 was used, and the wound cladding material [S4] was prepared like the example 3. (Coating weight of P2-1: 1microg/cm2)

[0089]

<Example 5>

Preparation of a wound cladding material [S5]

The cell growth factor cementing material content water solution [GS21] which contains the heparin sodium (Nakarai Tesuku, Inc. make) [G2-1] which is a cell growth factor cementing material (G2) by 50 ng/mL instead of the cell growth factor content water solution [GS11] of an example 3 was used, and the wound cladding material [S5] was prepared like the example 3. (Coating weight of P2-1: 1microg/cm2)

[0090]

<Example 6>

Preparation of a wound cladding material [S6]

The cell growth factor cementing material content water solution [GS22] which contains the hyaluronic acid [G2-2] (ICN biotechnology medical company make) which is a cell growth factor cementing material by 50 ng/mL instead of the cell growth factor content water solution [GS11] of an example 3 was used, and the wound cladding material [S6] was prepared like the example 3. (Coating weight of P2-1: 1microg/cm2)

[0091]

<Example 7>

Preparation of a cellular adhesiveness polypeptide [P2-2]

Cellular adhesiveness polypeptide [P2-1] 10mg obtained in the example 1 was supplied to what dissolved 0.096g of N and N'-carbonyldiimidazole (Wako Pure Chem, Inc. make) in dimethyl sulfoxide 5mL, and it was made to react to it for 10 minutes at 37 degrees C.

Next, ethylenediamine 0.107g was added and it was made to react at 37 degrees C for 20 hours. It supplied to the dialysis tube after the reaction, the ion exchange water of 1L performed dialysis of 2 hours 5 times, and the cellular adhesiveness polypeptide [P2-2] was obtained. (Number:60 piece / , molecule of the amino group with which P2-2 were embellished)

[0092]

In addition, the number of the amino group with which P2-2 were embellished was measured in the following procedures.

(1) 0mg of L-lysine, 10mg, 30mg, and 100mg were respectively dissolved in 1L of the carbonic acid buffer solution (following, CB) of 0.6M and pH9.5, and it considered as the standard series. Moreover, 1mg of P2-1 and P2-2 was respectively dissolved in 1mL of CB, and it considered as specimen liquid 1 and specimen liquid 2, respectively.

(2) A standard series, specimen liquid 1, and specimen liquid 2 were respectively thrown in with 100microL / test tube in the glass test tube, the water solution which contains 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid sodium (TNBS) at 7.2mg % of the weight further was added and stirred with 20microL / test tube, and it was left at the room temperature (25 degrees C) for 2 hours.

(3) Ion exchange water was added with 1mL / test tube 2 hours after, and spectrometry was carried out by 367nm.

(4) The absorbance of a standard series, the number of the amino group, and a calibration curve were created, and from the calibration curve, the number of the amino group of specimen liquid 1 and specimen liquid 2 was

computed, and it considered as the number of the amino group embellished with deducting the number of specimen liquid 1 from the number of specimen liquid 2. The quantum of the number of the amino group was carried out like the following.

[0093]

Preparation of a wound cladding material [S7]

Instead of P2-1 water solution of an example 2, PBS (P2-2 water solution) which contains a cellular adhesiveness polypeptide [P2-2] by 50microg/mL was used, and the wound cladding material [S7] was prepared like the example 2. (Coating weight of P2-2: 1microg/cm²)

[0094]

<Example 8>

Preparation of a wound cladding material [S11]

Instead of the cell growth factor content water solution [GS11] of an example 3, the polyethyleneimine water solution [GS13] which contains polyethyleneimine (the Wako Pure Chem Industries make) by 100microg/mL was used, and the wound cladding material [S11] was prepared like the example 3. (Coating weight of P2-1: 1microg/cm²)

[0095]

<Example 9>

Preparation of a cellular adhesiveness polypeptide [P2-3]

Cellular adhesiveness polypeptide [P2-1] 10mg obtained in the example 1 was supplied to what dissolved 0.096g of N and N'-carbonyldiimidazole (Wako Pure Chem, Inc. make) in dimethyl sulfoxide 5mL, and it was made to react to it for 10 minutes at 37 degrees C. Next, polyethyleneimine 0.357g was added and it was made to react at 37 degrees C for 20 hours. It supplied to the dialysis tube after the reaction, the ion exchange water of 1L performed dialysis of 2 hours 5 times, and the cellular adhesiveness polypeptide [P2-3] was obtained. (Number:three piece /, molecule of the amino group with which P2-3 were embellished)

[0096]

Preparation of a wound cladding material [S12]

Instead of P2-1 water solution of an example 2, PBS (P2-3 water solution) which contains a cellular adhesiveness polypeptide [P2-3] by 100microg/mL was used, and the wound cladding material [S12] was prepared like the example 2. (Coating weight of P2-3: 1microg/cm²)

[0097]

<The example 1 of a comparison>

Preparation of a wound cladding material [S8]

The difficulty biodegradability ingredient [N2] of an example 1 was used as the wound cladding material [S8] as it was.

[0098]

<The example 2 of a comparison>

Preparation of a wound cladding material [S9]

The collagen film (about 1mm in the Koken Co., Ltd. make, thickness) was used as the wound cladding material [S9] as it was.

[0099]

<The example 3 of a comparison>

Preparation of a wound cladding material [S10]

In "preparation of a wound cladding material [S1]" of an example 1, except omitting the autoclave sterilization of a cellular adhesiveness polypeptide [P2-0], it prepared like the example 1 and the wound cladding material [S10] was prepared.

[0100]

<Evaluation 1 (endotoxin concentration)>

The cellular adhesiveness polypeptide [P2-0], the cellular adhesiveness polypeptide [P2-1], the cellular adhesiveness polypeptide [P2-2], and the cellular adhesiveness polypeptide [P2-3] were made into the test portion for endotoxin content measurement. About each of this test portion, 1mg and 0.1mg were supplied to demineralization distilled water (sterile) (Wako Pure Chem Industries make) 1mL, and the specimen liquid of 1 mg/mL and 0.1 mg/mL was prepared. Moreover, the detection sensitivity of endotoxin measured specimen liquid according to the directions for use of a measurement kit, using RIMURUSU ES-2 single Test Wako (Wako Pure Chem industrial company make) of 0.015 EU/mL as a measurement kit.

[0101]

<Evaluation result 1>

Gel was formed for both specimen liquid of 1 mg/mL and 0.1 mg/mL (endotoxin positivity), and the endotoxin contents of a test portion of the cellular adhesiveness polypeptide [P2-0] were 0.015EU / 0.1mg or more, i.e., 0.15 EU/mg. [or more]

Gel was not formed for both specimen liquid of 1 mg/mL and 0.1 mg/mL (endotoxin negative), but the endotoxin content of a test portion of a cellular adhesiveness polypeptide [P2-1], [P2-2], and [P2-3] was less than 0.015 EU/mg.

[0102]

<Evaluation 2 (cell culture A)>

What cut off respectively wound cladding material [of examples 1-7 and the examples 1-3 of a comparison] [S1] - [S10] in 1cmx1cm magnitude was supplied to the base of 24 hole polystyrene plate (product made from BEKUTONDIKKINSON) in one sheet / hole, and after sticking the four corners of a wound cladding material on a base on a vinyl tape, in the clean bench, UV irradiation was performed for 8 hours and it sterilized. In addition, about one kind of wound cladding material, four holes were used and the same actuation was performed by four holes. It is the same as that of the following.

next, the object for normal Homo sapiens skin fibroblast growth — low — blood serum culture—medium (Kurabo Industries, Ltd. make) 1mL and 20,000 normal Homo sapiens skin fibroblasts (Kurabo Industries, Ltd. make) were supplied to 24 hole polystyrene plate 1 hole, and the cell culture for three days was performed in the incubator of 37 degrees C and CO2 concentration 5 capacity %.

Three days after culture, wound cladding material [S1] - [S10] is respectively removed from the base of a plate. Wound cladding material [S1] - [S10] is supplied to the base of new 24 hole polystyrene plate in one sheet / hole. The trypsin solution (the solution by which the 0.25g trypsin is dissolved into 100mL, trade name:Trypsin-EDTA, product made from in vitro JIEN, Inc.) of 0.25 weight / capacity % was fed into the pan in 200microL / hole, and it was left for 3 minutes at 25 degrees C.

It was made mixed liquor by supplying fetal calf serum (product made from Gibco BRL) in 20microL / hole, and carrying out pumping with a pipet after 3 minutes. 20microL of the mixed liquor, 30microL of the phosphate buffer solution (0.02M, pH7.2) which contains NaCl at 0.85 % of the weight, and 10microL of tetra-color one (Seikagaku make) were supplied to one hole of 96 hole polystyrene plate (product made from BEKUTONDIKKINSON), and were left in the incubator of 37 degrees C and CO2 concentration 5 capacity % for 4 hours.

4 hours after, the spectrophotometer was used, the amount of formazan generation was measured with the absorbance of 492nm (contrast wavelength of 630nm), and this value was made into cell activity. Cell activity is proportional to the height of the absorbance concerned. These results are shown in Table 1 (these results are average data for four holes respectively.). In addition, the tetrazolium salt of tetra-color one is returned by the dehydrogenase of an intracellular mitochondrion, and it colors by generating formazan. Moreover, removing a wound cladding material of the wound cladding material [S9] of the example 2 of a comparison from the base of a plate three days after culture was not completed by collapse of a configuration, and it was not able to measure cell activity.

[0103]

[Table 1]

	創傷被覆材	細胞活性 ($\lambda=492\text{nm}$ の吸光度)
実施例 1	創傷被覆材 [S 1]	0. 2 1
実施例 2	創傷被覆材 [S 2]	0. 3
実施例 3	創傷被覆材 [S 3]	0. 4 4
実施例 4	創傷被覆材 [S 4]	0. 3 3
実施例 5	創傷被覆材 [S 5]	0. 3 7
実施例 6	創傷被覆材 [S 6]	0. 3 7
実施例 7	創傷被覆材 [S 7]	0. 4
比較例 1	創傷被覆材 [S 8]	0. 1 4
比較例 2	創傷被覆材 [S 9]	測定不能
比較例 3	創傷被覆材 [S 1 0]	0. 1 8

[0104]

From the result of Table 1, the wound cladding materials S1-S7 of this invention are understood that the cell

activity of the cell pasted up on a wound cladding material is very high compared with the wound cladding materials S8-S10 of the example of a comparison. Moreover, collapse of a configuration [like the example 2 of a comparison] whose wound cladding material of this invention is was not produced.

[0105]

<Evaluation 3 (cell culture B)>

Each of the wound cladding material [S2] of examples 2, 8, and 9 and the example 1 of a comparison, [S11], [S12], and [S8] was cut off in the magnitude of 2 the diameter of 1cm, and the line sterilized UV irradiation in the clean bench for 8 hours.

On the other hand, according to the operation manual of this kit, culture dermis was produced using PreTissue-Dermal (Toyobo Co., Ltd. make) of a three-dimensions culture organization construction kit. Culture-medium exchange of the blood serum culture medium currently used by this kit was carried out after production to the DMEM culture medium (product made from ICN Biomedicals) which is a serum free medium, and it considered as the culture dermis under a non-blood serum environment.

The above-mentioned wound cladding material [S2], [S11], [S12], and [S8] were put on the top face of this culture dermis, and the cell culture for five days was performed in the incubator of 37 degrees C and CO2 concentration 5 capacity %. Five days after culture, a wound cladding material [S2], [S11], [S12], and [S8] are respectively removed from the top face of culture dermis. On the base of new 24 hole polystyrene plate, a wound cladding material [S2], [S11], [S12] and [S8] were supplied in one sheet / hole, further, 125microL / hole, and tetra-color one (Seikagaku make) were supplied in 25microL / hole, and PBS was left in the incubator of 37 degrees C and CO2 concentration 5 capacity % for 4 hours. 4 hours after, the spectrophotometer was used, the amount of formazan generation was measured with the absorbance of 492nm (contrast wavelength of 630nm), and this value was made into the cell activity 2. The cell activity 2 is proportional to the height of the absorbance concerned. These results are shown in Table 2 (these results are average data for four holes respectively.).

[0106]

[Table 2]

	創傷被覆材	細胞活性 2 ($\lambda=492\text{nm}$ の吸光度)
実施例 2	創傷被覆材 [S 2]	0 . 0 5 0
実施例 8	創傷被覆材 [S 1 1]	0 . 1 1 7
実施例 9	創傷被覆材 [S 1 2]	0 . 0 7 1
比較例 1	創傷被覆材 [S 8]	0 . 0 3 9

[0107]

From the result of Table 2, the wound cladding materials S2, S11, and S12 of this invention are understood that the cell activity of the cell by which migration is carried out to a wound cladding material from culture dermis is very high compared with the wound cladding material S8 of the example of a comparison.

[0108]

<Evaluation 4 (animal experiment A)>

To DM mouse (C57 BLK Jcl db/db, made in Japanese Clare, Inc.), inhalation-of-air anesthesia by diethylether was carried out, the whole regions-of-back surface was shaved using the feather razor, and all layer skin loss wounds [that it is circular in the center section (diameter of 1cm)] were produced. In addition, that by which the onset of diabetes mellitus is checked was used for DM mouse using the strip for a glycosuria check (UROISU, Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd. make).

What cut off respectively the wound cladding material [S2] of an example 2, the wound cladding material [S8] of the example 1 of a comparison, and the wound cladding material [S9] of the example 2 of a comparison in 2cmx2cm magnitude On an adhesion film (trade name: multi-fix, product made from ARUKEA, Inc.), lamination, It stuck and carried out so that a wound cladding material side might hit this wound surface, the absorbent cotton for raising adhesion with a wound surface further was piled up, and by the adhesive bandage (trade name: silky tex, product made from ARUKEA, Inc.), the truncus section perimeter was twisted and it fixed.

The growth environment made the room temperature of 24 degrees C, feed, and water supply the free intake condition. As the 14th day, the viewpoint removed the wound therapy ingredient from the wound surface on the 14th, extracted the whole wound including the target neoformation from the laboratory animal including the tunica muscularis which exists under neoformation, carried out immobilization and paraffin embedding processing, and produced the organization intercept. Hematoxylin and eosin stain (HE staining) processing of the produced

organization intercept was carried out, and neoformation was evaluated. The photograph of this neoformation is shown in drawing 1 (wound cladding material [S2]) and drawing 2 (wound cladding material [S8]).

In addition, in the macro-scopie view, although infection had not arisen in the wound surface using a wound cladding material [S2] and a wound cladding material [S8], infection had arisen in the wound surface using a wound cladding material [S9]. Moreover, organization extraction was impossible for the wound cladding material [S9] by conglutination with an organization.

From drawing 1, much neoformation and many cellular infiltration are seen and the thing using the wound cladding material [S2] of this invention of an example 2 can be said to be the good playback condition of accepting matrix production of a playback in-house so much.

From drawing 2, the thing using the wound cladding material [S8] of the example 1 of a comparison is deficient in neoformation and the cellular infiltration, and a playback condition can be said to be a defect.

[0109]

<Evaluation 5 (animal experiment B)>

(1) Application of the wound cladding material [S11] of an example 8

Replace with a wound cladding material [S2], [S8], and [S9], and the wound cladding material [S11] prepared in the example 8 is used. Except having changed having changed the magnitude of all layer skin loss wounds into the diameter of 1.4cm from the diameter of 1cm, and an adhesion film into BAIKURUSHIBU (trade name) by Johnson & Johnson Like evaluation 4 (animal experiment A), DM mouse was grown and the animal experiment of wound healing was started. In addition, the wound cladding material was removed from the wound surface after initiation on the 3rd, and the wound cladding material [S11] was again applied with the adhesion film.

(2) Application of the wound cladding material [S8] of the example 1 of a comparison, and a trafermin solution : 250microg of the Fiblast spray 250 (Kaken Pharmaceutical Co., Ltd. make) which are the bed sore and skin ulcer therapy agent of drugs was dissolved in the physiological saline of 2.5mL(s), and the trafermin solution of 100microg/mL was prepared.

It replaced with the wound cladding material [S11], and before making a wound cladding material rival with an adhesion film using the wound cladding material [S8] prepared in the example 1 of a comparison, except 0.2mL(s) (equivalent to trafermin 20microg) of a trafermin solution being dropped at all the above-mentioned layer skin loss wounds with a pipet, like the above (1), DM mouse was raised and the animal experiment of wound healing was started.

In addition, after removing a wound cladding material from a wound surface after initiation on the 3rd, trafermin solution 0.2mL was dropped at the loss wound, and the wound cladding material [S8] was again applied with the adhesion film.

(3) Observation of a wound healing condition

As the 7th day and the 14th day, the observation day removed the wound cladding material from the wound surface on the observation day, and performed macro-scopie observation of a wound surface. The photograph is shown in drawing 3 (the 7th day, wound cladding material [S11]), drawing 4 (the 7th day, a wound cladding material [S8], and trafermin solution), drawing 5 (the 14th day, wound cladding material [S11]), and drawing 6 (the 14th day, a wound cladding material [S8], and trafermin solution).

As for the thing using the wound cladding material [S11] of this invention of an example 8 as a result of the 7th day, the epidermination from a lip-of-wound perimeter enclosure was accepted (drawing 3). On the other hand, as for the thing using the wound cladding material [S8] and trafermin solution of the example 1 of a comparison, epidermination was not accepted (drawing 4).

As for the thing using the wound cladding material [S11] of this invention of an example 8 as a result of the 14th day, epidermination was accepted in the whole wound surface (drawing 5). On the other hand, although epidermination was accepted in a part of wound surface, as for the thing using the wound cladding material [S8] and trafermin solution of the example 1 of a comparison, epidermination was not accepted in the whole wound surface (drawing 6).

[Availability on industry]

[0110]

The wound cladding material of this invention demonstrates a good wound curative effect, when the cell contained in the exudate which exudes from the cell contained in ***** etc. or a wound pastes the wound cladding material of this invention. Effectiveness especially wonderful in respect of epidermination is shown.

As a cell which can be pasted up on the wound cladding material of this invention the cell (an epithelial cell —) which the cell of the Homo sapiens origin is suitable, for example, participates in the skin cells (a vascular endothelial cell —) which participate in a blood vessel, such as fibroblast, a vascular endothelial cell, and a smooth muscle cell Cells which participate in muscles, such as a smooth muscle cell and fibroblast (muscular cell etc.), The cells (fat cell etc.) which participate in a fat, the cell which participates in a nerve (nerve cell etc.), The cells (hepatocyte etc.) which participate in liver, the cell which participates in the pancreas (pancreas RA islet cell etc.), The cell which participates in the kidney (a kidney epithelial cell, a proximal tubule epithelial cell,

mesangial cell, etc.), The cell which participates in lungs and a bronchial tube (an epithelial cell, fibroblast, a vascular endothelial cell, smooth muscle cell, etc.), the cells (a visual cell, a cornea epithelial cell, cornea endothelial cell, etc.) which participate in an eye, and the cell (an epithelial cell —) which participates in a prostate gland Cells which participate in a bone, such as an interstitial cell and a smooth muscle cell (osteoblast, osteocyte, osteoclast, etc.), the cells (a chondroblast, chondrocyte, etc.) which participate in a cartilage, the cells (a periodontium cell, osteoblast, etc.) which participate in a gear tooth, the cells (a leucocyte, erythrocyte, etc.) which participate in blood, and a stem cell — {— for example A bone marrow undifferentiated mesenchyme system stem cell, a skeletal muscle stem cell, a hematopoietic-system stem cell, a neural stem cell, A liver stem cell (oval cell, small hepatocyte, etc.), A fat tissue stem cell, an embryonal trunk (ES) cell, an epidermis stem cell, an intestinal tract stem cell, a sperm stem cell, }, such as a germ reproduction trunk (EG) cell, pancreas stem cells (pancreatic duct epithelium stem cell etc.), a leucocyte system stem cell, a lymphoid stem cell, a cornea system stem cell, and precursor cells (a fat precursor cell, a blood vessel inner-bark precursor cell, a cartilage precursor cell, a lymphocytic-series precursor cell, NK precursor cell, etc.), etc. is mentioned.

[0111]

As application to the wound side of the wound cladding material of this invention, if it can cover to a wound side, it can apply without a limit, for example, you may fix using covering, dressings, an elastic mesh, or an eyepatch with adhesives or a binder etc., and may suture or paste up. Moreover, in the case of chronic wounds, such as an ulcer, application to the wound of a yellow term to a red term has a desirable wound, and, in the case of acute wounds, such as a burn and a traumatic skin deficiency, the application to the wound of a granulation formative period from an inflammation term has a desirable wound.

Furthermore, the wound cladding material of this invention is applicable also as a base material for cultivating the above-mentioned cell outside a body.

[Brief Description of the Drawings]

[0112]

[Drawing 1] It is the microphotography (one 45 times the scale factor of this) of the organization intercept in the <evaluation 4 (animal experiment A)> using the wound cladding material [S2] of this invention obtained in the example 2.

[Drawing 2] It is the microphotography (one 45 times the scale factor of this) of the organization intercept in the <evaluation 4 (animal experiment A)> using the wound cladding material for a comparison [S8] obtained in the example 1 of a comparison.

[Drawing 3] It is the photograph (one 3 times the scale factor of this) of the wound surface on the 7th in the <evaluation 5 (animal experiment B)> using the wound cladding material [S11] of this invention obtained in the example 8.

[Drawing 4] It is the photograph (one 3 times the scale factor of this) of the wound surface on the 7th in the <evaluation 5 (animal experiment B)> using the wound cladding material for a comparison [S8] obtained in the example 1 of a comparison.

[Drawing 5] It is the photograph (one 3 times the scale factor of this) of the wound surface on the 14th in the <evaluation 5 (animal experiment B)> using the wound cladding material [S11] of this invention obtained in the example 8.

[Drawing 6] It is the photograph (one 3 times the scale factor of this) of the wound surface on the 14th in the <evaluation 5 (animal experiment B)> using the wound cladding material for a comparison [S8] obtained in the example 1 of a comparison.

[Translation done.]

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-49921

(P2004-49921A)

(43) 公開日 平成16年2月19日 (2004.2.19)

(51) Int. Cl.⁷

A61L 15/44

F I

A61L 15/03

テーマコード (参考)

4C081

審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 29 頁)

(21) 出願番号	特願2003-276313 (P2003-276313)	(71) 出願人	000002288 三洋化成工業株式会社 京都府京都市東山区一橋野本町11番地の1
(22) 出願日	平成15年7月17日 (2003.7.17)		
(31) 優先権主張番号	特願2002-211671 (P2002-211671)	(71) 出願人	000151380 アルケア株式会社 東京都墨田区京島1丁目21番10号
(32) 優先日	平成14年7月19日 (2002.7.19)	(74) 代理人	100086586 弁理士 安富 康男
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(74) 代理人	100115141 弁理士 野田 慎二
		(72) 発明者	黒川 祐人 京都府京都市東山区一橋野本町11番地の1 三洋化成工業株式会社内
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 創傷被覆材

(57) 【要約】

【課題】 人体に悪影響を及ぼす微生物や微生物由来物質等の混入が極めて低く、且つ、滲出液等との接触があっても創傷被覆材の形態が保たれる創傷被覆材を提供することである。

【解決手段】 エンドトキシンの含有量が細胞接着性ポリペプチド (P) の重量に基づいて0.15 EU/mg未満である細胞接着性ポリペプチド (P) と被覆材料 (N) とからなることを特徴とする創傷被覆材を用いる。また、被覆材料 (N) が難生分解性材料 (N2) であること、また、細胞接着性ポリペプチド (P) が細胞接着性人工ポリペプチド (P2) であることが好ましい。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

エンドトキシンの含有量が細胞接着性ポリペプチド (P) の重量に基づいて 0.15 EU/mg 未満である細胞接着性ポリペプチド (P) と被覆材料 (N) とからなることを特徴とする創傷被覆材。

【請求項 2】

被覆材料 (N) が難生分解性材料 (N2) である請求項 1 に記載の創傷被覆材。

【請求項 3】

細胞接着性ポリペプチド (P) が細胞接着性人工ポリペプチド (P2) である請求項 1 又は 2 に記載の創傷被覆材。

10

【請求項 4】

細胞接着性ポリペプチド (P) が、Arg Gly Asp 配列、Leu Asp Val 配列、Arg Glu Asp Val 配列 (1)、Tyr Ile Gly Ser Arg 配列 (2)、Pro Asp Ser Gly Arg 配列 (3)、Arg Tyr Val Val Leu Pro Arg 配列 (4)、Leu Gly Thr Ile Pro Gly 配列 (5)、Arg Asn Ile Ala Glu Ile Ile Lys Asp Ile 配列 (6)、Ile Lys Val Ala Val 配列 (7)、Leu Arg Glu 配列、Asp Gly Glu Ala 配列 (8)、Gly Val Lys Gly Asp Lys Gly Asn Pro Gly Trp Pro Gly Ala Pro 配列 (9)、Gly Glu Phe Tyr Phe Asp Leu Arg Leu Lys Gly Asp Lys 配列 (10)、His Ala Val 配列及び Tyr Lys Leu Asn Val Asn Asp Ser 配列 (11) からなる群より選ばれる少なくとも 1 種の最小アミノ酸配列 (X) を含んでなる請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の創傷被覆材。

20

【請求項 5】

細胞接着性ポリペプチド (P) が被覆材料 (N) に化学結合されてなる請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載の創傷被覆材。

【請求項 6】

さらに、細胞増殖因子 (G1) 及び／又は細胞増殖因子結合物質 (G2) を含んでなる請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載の創傷被覆材。

【請求項 7】

細胞接着性ポリペプチド (P) がアミノ基又はアンモニオ基を含有する化合物 (AM) で修飾されてなる請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載の創傷被覆材。

【請求項 8】

30

細胞接着性ポリペプチド (P) が、さらに耐熱性アミノ酸配列 (Y) を含んでなる請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の創傷被覆材。

【請求項 9】

耐熱性アミノ酸配列 (Y) が Gly Ala Gly Ala Gly Ser 配列 (12) 及び／又は Gly Val Gly Val Pro 配列 (13) である請求項 8 に記載の創傷被覆材。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、創傷被覆材に関する。さらに詳しくは、細胞接着性ポリペプチドを有する創傷被覆材に関する。

40

【背景技術】

【0002】

従来、細胞接着性ポリペプチドを有する創傷被覆材として、天然由来のコラーゲンをシートやスポンジ状に加工した創傷被覆材 (特許文献 1) や、皮膚由来の線維芽細胞をコラーゲンシート上又はコラーゲンシート中で培養して得られる線維芽細胞含有コラーゲンシート (特許文献 2) 等が知られている。

【0003】

【特許文献 1】 特開平 7-59812 号公報

【特許文献 2】 特開平 9-47502 号公報

【発明の開示】

50

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

従来の細胞接着性ポリペプチドを有する創傷被覆材は主たる構成物質が蛋白質であるため、人体に悪影響を及ぼす微生物や微生物由来物質等が創傷被覆材中に混入することによる感染等の問題があり、また、創傷からの滲出液により崩壊されて創傷被覆材の形態が失われてしまい、創傷被覆材を創傷面に適用する時に貼り替えができない等の問題点があった。すなわち、本発明の目的は、人体に悪影響を及ぼす微生物や微生物由来物質等の混入が極めて低く、且つ、滲出液等との接触があっても創傷被覆材の形態が保たれる創傷被覆材を提供することである。

【課題を解決するための手段】

10

【0005】

本発明者は、鋭意研究を重ねてきた結果、特定のペプチド及び被覆材料を使用することにより上記目的を達成することを見だし、本発明に到達した。すなわち、本発明の創傷被覆材の特徴は、エンドトキシンの含有量が細胞接着性ポリペプチド(P)の重量に基づいて0.15 EU/mg未満である細胞接着性ポリペプチド(P)と被覆材料(N)とからなる点を要旨とする。

【発明の効果】

【0006】

本発明の創傷被覆材は、エンドトキシン含有量が極めて少なく、また、創傷被覆材上に細胞を極めて効率良く接着できる。さらに、本発明の創傷被覆材を創傷面に適用すると、創傷面が感染や癒合することなく極めて良好な再生状態にできる。従って、本発明の創傷被覆材は、微生物や微生物由来物質等の混入の危険性が少なく、また創傷被覆材の貼り替えが容易で、且つ創傷の治療を促進できる。

20

【発明を実施するための最良の形態】

【0007】

細胞接着性ポリペプチド(P)は、細胞接着シグナルを現わす最小アミノ酸配列(X)を含んでいる。細胞接着シグナルを現わす最小アミノ酸配列(X)としては、例えば、「病態生理、第9巻 第7号、527～535頁、1990年」や「大阪府立母子医療センター雑誌、第8巻 第1号、58～66頁、1992年」に記載されているもの等が用いられる。

30

【0008】

これらの最小アミノ酸配列(X)の中で、Arg Gly Asp配列、Leu Asp Val配列、Arg Glu Asp Val配列(1)、Tyr Ile Gly Ser Arg配列(2)、Pro Asp Ser Gly Arg配列(3)、Arg Tyr Val Val Leu Pro Arg配列(4)、Leu Gly Thr Ile Pro Gly配列(5)、Arg Asn Ile Ala Glu Ile Ile Lys Asp Ile配列(6)、Ile Lys Val Ala Val配列(7)、Leu Arg Glu配列、Asp Gly Glu Ala配列(8)、Gly Val Lys Gly Asp Lys Gly Asn Pro Gly Trp Pro Gly Ala Pro配列(9)、Gly Glu Phe Tyr Phe Asp Leu Arg Leu Lys Gly Asp Lys配列(10)、His Ala Val配列及びTyr Lys Leu Asn Val Asn Asp Ser配列(11)が好ましく、細胞接着性の観点から、さらに好ましくはArg Gly Asp配列、Tyr Ile Gly Ser Arg配列(2)及びIle Lys Val Ala Val配列(7)であり、特に好ましくはArg Gly Asp配列である。なお、アミノ酸配列は3文字表記で現し、()内に配列表に対応する配列番号を記載する(以下、同じである。)

40

【0009】

細胞接着性ポリペプチド(P)は、前記最小アミノ酸配列(X)を1分子中に少なくとも1個有すればよいが、細胞接着性の観点から、1分子中に2個以上有するものが好ましく、3個以上有するものがさらに好ましく、5個以上有するものが特に好ましく、また、1分子中に50個以下有するものが好ましく、30個以下有するものがさらに好ましく、20個以下有するものが特に好ましい。また、2種以上の配列が1分子中に含まれてもよい。

【0010】

50

細胞接着性ポリペプチド (P) の数平均分子量 (M_n) は、細胞接着性の観点から、3, 000, 000 以下が好ましく、さらに好ましくは1, 000, 000 以下、特に好ましくは300, 000 以下であり、また300 以上が好ましく、さらに好ましくは1, 000 以上、特に好ましくは3, 000 以上である。なお、細胞接着性ポリペプチド (P) の M_n は、SDS-PAGE (SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動) 法で、細胞接着性ポリペプチド (P) を分離し、泳動距離を標準物質と比較することによって求めるものである (以下、同じである。)

【0011】

細胞接着性ポリペプチド (P) としては、細胞接着性天然ポリペプチド (P1) 及び細胞接着性人工ポリペプチド (P2) 等が使用できるが、細胞接着シグナルを現わす最小アミノ酸配列 (X) 及び耐熱性アミノ酸配列 (Y) の数や配置等を自由に設計でき、細胞接着性を高めたり、加熱処理による滅菌やエンドトキシンの分解を容易にできるという点で、細胞接着性人工ポリペプチド (P2) が好ましい。

【0012】

細胞接着性天然ポリペプチド (P1) としては、基底膜に存在する糖タンパク (例えば、ラミニン、エンタクチン (ナイドジェン)、テネイシン、アグリン、オステオネクチン、オステオカルシン、オステオポンチン、フィブリン、フィブリノーゲン、ビトロネクチン、アンカリン、バミン及びトロネンボスポンジン等)、プロテオグリカン (例えば、アグリカン、パルカン、ビグリカン、デコリン、フィブロモジュリン、パーシカン、デュリン、ニューロカン、プレビカン、ルーミカン、セルグリシン、シンデカン、CD44、ペータグリカン、トロネンボモデュリン、グリピカン、セレブログリカン及びNG2プロテオグリカン等)、細胞膜に存在する糖タンパク (例えば、インテグリン、インテグリンスーパーファミリー、カドヘリン及びカドヘリンスーパーファミリー等)、及びタイトジャンクションに関する物質 (例えば、オクルディン等) 等が挙げられる。

【0013】

細胞接着性人工ポリペプチド (P2) としては、例えば、Tyr Ile Gly Ser Arg配列 (2) からなるポリペプチド、Ile Lys Val Ala Val配列 (7) からなるポリペプチド、Arg Gly Asp Ser配列 (14) からなるポリペプチド、Gly Arg Gly Asp Ser配列 (15) からなるポリペプチド、Gly Arg Gly Asp Ser Pro配列 (16) からなるポリペプチド、Arg Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro配列 (17) からなるポリペプチド、Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ala配列 (18) からなるポリペプチド、Pro Gly Ala Ser Ile Lys Val Ala Val Ser Ala Gly Pro Ser配列 (19) からなるポリペプチド、Cys Ser Arg Ala Arg Lys Gln Ala Ala Ser Ile Lys Val Ala Val Ser Ala Asp Arg配列 (20) からなるポリペプチド、Val Cys Glu Pro Gly Tyr Ile Gly Ser Arg Cys Asp配列 (21) からなるポリペプチド、及び、これらの少なくとも一種のポリペプチドからなる重合体等が例示できる。これらの他に、重合体として、例えば、(Arg Gly Asp Ser)₄ 配列 (22) からなる重合体、(Arg Gly Asp Ser)₂ 配列 (23) からなる重合体、(Arg Gly Asp Ser)₃ 配列 (24) からなる重合体、(Gly Arg Gly Asp Ser)₂ 配列 (25) からなる重合体、(Gly Arg Gly Asp Ser Pro)₂ 配列 (26) からなる重合体、(Arg Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro)₂ 配列 (27) からなる重合体、(Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ala)₂ 配列 (28) からなる重合体、(Pro Gly Ala Ser Ile Lys Val Ala Val Ser Ala Gly Pro Ser)₂ 配列 (29) からなる重合体、(Cys Ser Arg Ala Arg Lys Gln Ala Ala Ser Ile Lys Val Ala Val Ser Ala Asp Arg)₂ 配列 (30) からなる重合体、又は、(Val Cys Glu Pro Gly Tyr Ile Gly Ser Arg Cys Asp)₂ 配列 (31) からなる重合体等が挙げられる。この重合体の重合度 (繰り返し単位個数) は、細胞接着性の観点より、2 以上が好ましく、3 以上がさらに好ましく、4 以上が特に好ましく、また、50 以下が好ましく、30 以下がさらに好ましく、20 以下が特に好ましく、16 以下が最も好ましい。

【0014】

細胞接着性人工ポリペプチド (P2) は、さらに細胞接着シグナルを現わす最小アミノ酸

配列 (X) 以外の耐熱性アミノ酸配列 (Y) を含むことが好ましい。耐熱性アミノ酸配列 (Y) としては、Gly Ala Gly Ala Gly Ser配列 (12)、Gly Val Gly Val Pro配列 (13)、Gly Pro Pro配列、Gly Ala Gln Gly Pro Ala Gly Pro Gly配列 (32)、Gly Ala Pro Gly Thr Pro Gly Pro Gln Gly Leu Pro Gly Ser Pro配列 (34)、Gly Ala配列、Gly Ala Gly Ala Gly Tyr (35) 配列、Gly Ala Gly Val Gly Tyr配列 (36)、Gly Ala Gly Tyr Gly Val配列 (37)、Asp Gly Gly (Ala)_{1,2} Gly Gly Ala配列 (38)、Gly Val Pro Gly Val配列 (39)、Gly、Ala、及びGly Gly Ala配列等が挙げられる。これらの耐熱性アミノ酸配列 (Y) を含むと、熱に対する安定性がさらに増し、細胞接着性ポリペプチドや細胞接着性ポリペプチド含有基材をオートクレーブ等で熱滅菌しやすくなる。これら耐熱性アミノ酸配列 (Y) のうち、優れた耐熱性が得られることから、Gly Ala Gly Ala Gly Ser配列 (12)、Gly Val Gly Val Pro配列 (13) 及びGly Pro Pro配列が好ましく、さらに好ましくはGly Ala Gly Ala Gly Ser配列 (12) である。

【0015】

耐熱性アミノ酸配列 (Y) は、熱に対する安定性をさらに向上させるため、同種又は異種の (Y) が繰り返していることが好ましい。耐熱性アミノ酸配列 (Y) の重合度 (繰り返し単位個数) は、2～100個が好ましく、さらに好ましくは3～50個、特に好ましくは4～30個であり、最も好ましくは4～20個である。

耐熱性アミノ酸配列 (Y) を含む場合、(Y) は細胞接着性人工ポリペプチド (P2) の何れかの位置に含まれていればよいけれど、(Y) とアミノ酸配列 (X) とは、細胞接着性人工ポリペプチド (P2) のβターン構造の取りやすさの観点から、(Y) の重合体と (X) とが交互に位置することが好ましい。

【0016】

細胞接着性人工ポリペプチド (P2) が耐熱性アミノ酸配列 (Y) を有してなる場合、耐熱性アミノ酸配列 (Y) の含有量は、熱に対する安定性の観点から、細胞接着性人工ポリペプチド (P2) の1分子中に、3個以上有するものが好ましく、さらに好ましくは10個以上、特に好ましくは30個以上有するものであり、また、10、000個以下有するものが好ましく、さらに好ましくは3、000個以下、特に好ましくは1、000個以下有するものである。

【0017】

細胞接着性人工ポリペプチド (P2) が耐熱性アミノ酸配列 (Y) を有してなるものとしては、例えば、特表平3-502935号公報及びHandbook of Biodegradable Polymers, Harwood Academic Publishers, Amsterdamに記載されている次のポリペプチドが挙げられる。すなわち、(Gly Ala Gly Ala Gly Ser)₂ 配列 (40) とArg Gly Asp配列とをそれぞれ約13個ずつ有するM_n約10万のポリペプチド (SLPF)、(Gly Ala Gly Ala Gly Ser)₂ 配列 (40) とTyr Ile Gly Ser Arg配列 (2) とをそれぞれ約13個ずつ有するM_n約10万のポリペプチド、(Gly Ala Gly Ala Gly Ser)₂ 配列 (40) とIle Lys Val Ala Val配列 (7) とをそれぞれ約13個ずつ有するM_n約10万のポリペプチド、(Gly Val Gly Val Pro)₂ 配列 (41) と(Gly Ala Gly Ala Gly Ser)_{1,2} 配列 (42) とArg Gly Asp配列とをそれぞれ約12個ずつ有するM_n約10万のポリペプチド、及び(Gly Ala Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro)₂ (43) 配列とArg Gly Asp配列とをそれぞれ約6個ずつ有するM_n約5万のポリペプチド等が挙げられる。

【0018】

以上の他に耐熱性アミノ酸配列 (Y) を有してなる細胞接着性人工ポリペプチド (P2) として、以下の (1)～(3) に示す最小アミノ酸配列 (X) と耐熱性アミノ酸配列 (Y) とが交互に化学結合してなる構造を有するポリペプチド等も使用できる。

(1) 最小アミノ酸配列 (X) がArg Gly Asp配列 (x1) の場合

(x1) の5個とSer Pro Ala Gly Gly (Ala Gly Ala Gly Ser Gly)₃ Ala Ser Thr Gly配列 (44) (y1) の4個とを有するポリペプチド (45)、(x1) の10個と(y1) の9個とを有するポリペプチド (46)、(x1) の15個と(y1) の14個とを

有するポリペプチド(47)、(x1)の4個とSer Pro Ala (Gly Val Pro Gly Val)₂ Gly Gly (Gly Ala Gly Ala Gly Ser)₃ Ala Ser Thr Gly 配列(48)(y2)の3個とを有するポリペプチド(49)、(x1)の8個と(y2)の7個とを有するポリペプチド(50)、(x1)の12個と(y2)の11個とを有するポリペプチド(51)、(x1)の5個とSer Pro Ala Ala Ser Asp Gly Gly (Ala)_{1 2} Gly Gly Ala Ala Ser Thr Gly 配列(52)(y3)の4個とを有するポリペプチド(53)、(x1)の10個と(y3)の9個とを有するポリペプチド(54)、(x1)の15個と(y3)の14個とを有するポリペプチド(55)、(x1)の5個と(Gly Ala)_{1 3} 配列(y4)(56)の4個とを有するポリペプチド(57)、(x1)の10個と(y4)の9個とを有するポリペプチド(58)、及び(x1)の15個と(y4)の14個とを有するポリペプチド(59)等。

【0019】

(2) 最小アミノ酸配列(X)がTyr Ile Gly Ser Arg配列(2)(x2)の場合
(x2)の5個とSer Pro Ala Gly Gly (Ala Gly Ala Gly Ser Gly)₃ Ala Ser Thr Gly 配列(44)(y1)の4個とを有するポリペプチド(60)、(x2)の10個と(y1)の9個とを有するポリペプチド(61)、(x2)の15個と(y1)の14個とを有するポリペプチド(62)、(x2)の4個とSer Pro Ala (Gly Val Pro Gly Val)₂ Gly Gly (Gly Ala Gly Ala Gly Ser)₃ Ala Ser Thr Gly 配列(48)(y2)の3個とを有するポリペプチド(63)、(x2)の8個と(y2)の7個とを有するポリペプチド(64)、(x2)の12個と(y2)の11個とを有するポリペプチド(65)、(x2)の5個とSer Pro Ala Ala Ser Asp Gly Gly (Ala)_{1 2} Gly Gly Ala Ala Ser Thr Gly 配列(52)(y3)の4個とを有するポリペプチド(66)、(x2)の10個と(y3)の9個とを有するポリペプチド(67)、(x2)の15個と(y3)の14個とを有するポリペプチド(68)、(x2)の5個と(Gly Ala)_{1 3} 配列(y4)(56)の4個とを有するポリペプチド(69)、(x2)の10個と(y4)の9個とを有するポリペプチド(70)、及び(x2)の15個と(y4)の14個とを有するポリペプチド(71)等。

【0020】

(3) 最小アミノ酸配列(X)がIle Lys Val Ala Val配列(7)(x3)の場合
(x3)の5個とSer Pro Ala Gly Gly (Ala Gly Ala Gly Ser Gly)₃ Ala Ser Thr Gly 配列(44)(y1)の4個とを有するポリペプチド(72)、(x3)の10個と(y1)の9個とを有するポリペプチド(73)、(x3)の15個と(y1)の14個とを有するポリペプチド(74)、(x3)の4個とSer Pro Ala (Gly Val Pro Gly Val)₂ Gly Gly (Gly Ala Gly Ala Gly Ser)₃ Ala Ser Thr Gly 配列(48)(y2)の3個とを有するポリペプチド(75)、(x3)の8個と(y2)の7個とを有するポリペプチド(76)、(x3)の12個と(y2)の11個とを有するポリペプチド(77)、(x3)の5個とSer Pro Ala Ala Ser Asp Gly Gly (Ala)_{1 2} Gly Gly Ala Ala Ser Thr Gly 配列(52)(y3)の4個とを有するポリペプチド(78)、(x3)の10個と(y3)の9個とを有するポリペプチド(79)、(x3)の15個と(y3)の14個とを有するポリペプチド(80)、(x3)の5個と(Gly Ala)_{1 3} 配列(y4)(21)の4個とを有するポリペプチド(81)、(x3)の10個と(y4)の9個とを有するポリペプチド(82)、及び(x3)の15個と(y4)の14個とを有するポリペプチド(83)等。

【0021】

市場から入手できる細胞接着性人工ポリペプチド(P2)としては、商品名を記載すると、例えばRGDS [Arg Gly Asp Ser配列(14)からなるポリペプチド、M_n約400、ペプチド研究所社製]、GRGDS [Gly Arg Gly Asp Ser配列(15)からなるポリペプチド、M_n約500、ペプチド研究所社製]、プロネクチンF [Arg Gly Asp配列と(Gly Ala Gly Ala Gly Ser)₃ 配列(40)とを各々約13個有し、遺伝子組み換え大腸菌により製造されるポリペプチド、M_n約10万、三洋化成工業(株)製]、プロネクチン

F プラス [プロネクチンFをジメルアミノエチルクロライドと反応させて水可溶性にしたもの、三洋化成工業社製] 及びプロネクチンL [Ile Lys Val Ala Val配列(7)と(Gly Ala Gly Ala Gly Ser)₂配列(40)とを各々約13個有し、遺伝子組み換え大腸菌により製造されるポリペプチド、M_n約10万、三洋化成工業社製] 等が挙げられる。

【0022】

細胞接着性人工ポリペプチド(P2)は、人工的に製造されるものであり、例えば、有機合成法(酵素法、固相合成法及び液相合成法等)、及び遺伝子組み換え法等によって容易に製造できる。有機合成法に関しては、例えば、生化学実験講座1、タンパク質の化学I V(1981年7月1日、日本生化学会編、株式会社東京化学同人発行)又は続生化学実験講座2、タンパク質の化学(下)(昭和62年5月20日、日本生化学会編、株式会社東京化学同人発行)に記載されている方法等が適用できる。遺伝子組み換え法に関しては、例えば、特表平3-502935号公報に記載されている方法等が適用できる。なお、遺伝子組み換え法による場合、組み換え微生物由来の不純物を含むことがあるため、抗ポリペプチド抗体等を用いたアフィニティ精製等によって精製し、ポリペプチドの純度を80重量%以上にすることが好ましく、さらに好ましくは90重量%以上、特に好ましくは95重量%以上である。これらのうち、細胞接着性ポリペプチドのアミノ酸配列を容易に設計・製造できるという観点から、遺伝子組み換え法が好ましい。

【0023】

有機合成法による細胞接着性人工ポリペプチドとしては、例えば、Arg Gly Asp Ser配列(14)からなるポリペプチド(M_n約400)、Gly Arg Gly Asp Ser配列(15)からなるポリペプチド(M_n約500)、Gly Arg Gly Asp Ser Pro配列(16)からなるポリペプチド(M_n約600)、又は、Arg Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro配列(17)からなるポリペプチド(M_n約1000)等のポリペプチド、及び、その他の重合体等が用いられる。上記重合体としては、例えば、(Arg Gly Asp Ser)₄配列(22)からなる重合体(M_n約1700)、(Arg Gly Asp Ser)₃配列(23)からなる重合体(M_n約3000)、(Arg Gly Asp Ser)₂配列(24)からなる重合体(M_n約7000)、(Gly Arg Gly Asp Ser)₃配列(25)からなる重合体(M_n約4000)、(Gly Arg Gly Asp Ser Pro)₃配列(26)からなる重合体(M_n約5000)、又は、(Arg Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro)₄配列(27)からなる重合体(M_n約4000)等が挙げられる。これらの重合体の重合度(繰り返し単位個数)は、2~50が好ましく、さらに好ましくは3~30、特に好ましくは4~20、最も好ましくは4~16である。

【0024】

遺伝子組み換え法による細胞接着性人工ポリペプチドとしては、例えば、(Gly Ala Gly Ala Gly Ser)₂配列(40)とArg Gly Asp配列とをそれぞれ約13個ずつ有するM_n約10万のポリペプチド(SLPF)、(Gly Ala Gly Ala Gly Ser)₂配列(40)とTyr Ile Gly Ser Arg配列(2)とをそれぞれ約13個ずつ有するM_n約10万のポリペプチド、(Gly Ala Gly Ala Gly Ser)₂配列(40)とIle Lys Val Ala Val配列(7)とをそれぞれ約13個ずつ有するM_n約10万のポリペプチド、(Gly Val Gly Val Pro)₂配列(41)と(Gly Ala Gly Ala Gly Ser)₂配列(42)とArg Gly Asp配列とをそれぞれ約12個ずつ有するM_n約10万のポリペプチド、及び(Gly Ala Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro)₂配列(43)とArg Gly Asp配列とをそれぞれ約6個ずつ有するM_n約5万のポリペプチド等が挙げられる。

【0025】

細胞接着性ポリペプチド(P)は、多くの細胞を創傷被覆材上に保持でき、治癒期間がより短縮できるという観点から、アミノ基及び/又はアンモニオ基を含有する化合物(AM)で修飾されていることが好ましい。

【0026】

アミノ基及び/又はアンモニオ基を含有する化合物(AM)としては、ポリアミン、アミノアルコール、アミノ基を有するハロゲン化物、アミノ基含有モノマー及びアミノ基含有モノマーの重合体並びにこれらの4級化物等が使用できる。

10

20

30

40

50

ポリアミンとしては、少なくとも1個の1級アミノ基又は2級アミノ基を有するポリアミン（炭素数2～56）等が用いられ、脂肪族ポリアミン、脂環式ポリアミン、複素環式ポリアミン及び芳香族ポリアミン等が用いられる。

【0027】

脂肪族ポリアミンとしては、アルキレンジアミン（エチレンジアミン、プロピレンジアミン、トリメチレンジアミン、テトラメチレンジアミン及びヘキサメチレンジアミン等）、アルキレン基の炭素数が2～6であるポリアルキレンポリアミン（ジエチレントリアミン、イミノビスプロピルアミン、トリエチレントトラミン、テトラエチレンペンタミン及びペンタエチレンヘキサミン等）、及びこれらのアルキル（炭素数1～18）置換体（ジメチルアミノプロピルアミン、ジエチルアミノプロピルアミン、ジプロピルアミノプロピルアミン、メチルエチルアミノプロピルアミン、トリメチルヘキサメチレンジアミン、N，N-ジオクタデシルエチレンジアミン、トリオクタデシルエチレンジアミン及びメチルイミノビスプロピルアミン等）等が挙げられる。

【0028】

脂環式ポリアミンとしては、1，3-ジアミノシクロヘキサン、1，3-ビス（メチルアミノ）シクロヘキサン、1，3-ビス（ジヒドロキシアミノ）シクロヘキサン、イソホロンジアミン、メンタレンジアミン及び4，4'-メチレンジシクロヘキサレンジアミン等が挙げられる。

複素環式ポリアミンとしては、ピペラジン、N-メチルピペラジン、N-アミノエチルピペラジン及び1，4-ジアミノエチルピペラジン等が挙げられる。

芳香族ポリアミンとしては、フェニレンジアミン、N，N'-ジメチルフェニレンジアミン、N，N，N'-トリメチルフェニレンジアミン、ジフェニルメタレンジアミン及び2，6-ジアミノピリジン、トリレンジアミン、ジエチルトリレンジアミン、4，4'-ビス（メチルアミノ）ジフェニルメタン及び1-メチル-2-メチルアミノ-4-アミノベンゼン等が挙げられる。

【0029】

アミノアルコールとしては、炭素数2～58のアミノアルコール等が用いられ、炭素数2～10のアルカノールアミン〔モノエタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン、モノイソプロパノールアミン、モノブタノールアミン、トリエタノールアミン、トリプロパノールアミン、トリブタノールアミン、N，N-ビス（ヒドロキシエチル）エチレンジアミン及びN，N，N'，N'-テトラキス（ヒドロキシエチル）エチレンジアミン等〕、これらのアルキル（炭素数1～18）置換体〔N，N-ジメチルエタノールアミン、N，N-ジエチルエタノールアミン、N-エチルジエタノールアミン、N-オクタデシルジエタノールアミン、N，N-ジエチル-N'，N'-ビス（ヒドロキシエチル）エチレンジアミン、N，N-ジオクタデシル-N'，N'-ビス（ヒドロキシエチル）エチレンジアミン及びN，N，N'-トリオクタデシル-N'-ヒドロキシエチルエチレンジアミン等〕等が挙げられる。

【0030】

アミノ基を有するハロゲン化物としては、炭素数2～17のアルキルアミンのハロゲン（塩素及び臭素等）化物等が用いられ、アミノエチルクロリド、N-メチルアミノプロピルクロリド、ジメチルアミノエチルクロリド、ジエチルアミノエチルクロリド、ジベンジルアミノエチルプロミド、ジメチルアミノプロピルプロミド、ジエチルアミノプロピルクロリド及びジベンジルアミノプロピルクロリド等が挙げられる。

【0031】

アミノ基含有モノマーとしては、炭素数5～21のアミノ基含有ビニル化合物、エチレンイミン及び炭素数2～20のアミノ酸等が用いられる。

アミノ基含有ビニル化合物としては、アミノ基含有（メタ）アクリレート、アミノ基含有（メタ）アクリルアミド、アミノ基含有芳香族ビニル炭化水素及びアミノ基含有アリルエーテル等が用いられる。なお、（メタ）アクリルアミドは、アクリルアミド及び／又はメタクリルアミドを意味する。

【0032】

アミノ基含有（メタ）アクリレートとしては、アミノエチル（メタ）アクリレート、N-メチルアミノエチル（メタ）アクリレート、N，N-ジメチルアミノエチル（メタ）アクリレート、N，N-ジエチルアミノプロピル（メタ）アクリレート、N，N-ジプロピルアミノエチル（メタ）アクリレート、N-ベンジル-N-メチルアミノエチル（メタ）アクリレート、N，N-ジベンジルアミノエチル（メタ）アクリレート、N，N-ジベンジルアミノプロピル（メタ）アクリレート、モルホリノエチル（メタ）アクリレート及びN-メチルピペチジノエチル（メタ）アクリレート等が挙げられる。

【0033】

アミノ基含有（メタ）アクリルアミドとしては、アミノエチルアクリルアミド、N-メチルアミノプロピルアクリルアミド、N，N-ジメチルアミノエチル（メタ）アクリルアミド、N，N-ジエチルアミノプロピル（メタ）アクリルアミド、N，N-ジプロピルアミノエチル（メタ）アクリルアミド、N-ベンジル-N-メチルアミノエチル（メタ）アクリルアミド、モルホリノエチル（メタ）アクリルアミド及びN-メチルピペチジノエチル（メタ）アクリルアミド等が挙げられる。

【0034】

アミノ基含有芳香族ビニル炭化水素としては、アミノエチルスチレン、N-メチルアミノエチルスチレン、N，N-ジメチルアミノスチレン、N，N-ジプロピルアミノスチレン及びN-ベンジル-N-メチルアミノスチレン等が挙げられる。

アミノ基含有アリルエーテルとしては、アミノエチルアリルエーテル、N-メチルアミノエチルアリルエーテル、N，N-ジメチルアミノエチルアリルエーテル及びN，N-ジエチルアミノエチルアリルエーテル等が挙げられる。

【0035】

アミノ酸としては、アルギニン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、スレオニン、トリプトファン、チロシン、バリン、アラニン、アスパラギン、アスパラギン酸、グルタミン、グルタミン酸、プロリン、システイン、リシン、セリン、グリシン、3-アミノプロピオン酸、8-アミノオクタン酸及び20-アミノエイコサン酸等が挙げられる。

【0036】

アミノ基含有モノマーの重合体としては、アミノ基含有ビニル化合物からなるビニルポリマー、ポリエチレンイミン及びポリペプチド（細胞接着性ポリペプチド（P）は含まない。）等が挙げられる。アミノ基含有モノマーの重合体の重量平均分子量500以上が好ましく、さらに好ましくは1,000以上、特に好ましくは2,000以上であり、また1,000,000以下が好ましく、さらに好ましくは800,000以下、特に好ましくは500,000以下である。なお、重量平均分子量は、ゲルパーミエーションクロマトグラフィー（GPC）で測定することができる。なお、基準物質としては、例えば、分子量420～20,600,000のポリスチレンスタンダード（東ソー製）が利用できる。

【0037】

これらの4級化物としては、これらのアミノ基を4級化剤（メチルクロリド、エチルクロリド、ベンジルクロリド、ジメチル炭酸、ジメチル硫酸及びエチレンオキシド等）によって4級化したもの等が挙げられる。

【0038】

アミノ基及び／又はアンモニオ基を含有する化合物（AM）で修飾する方法としては、例えば、アミノ基及び／又はアンモニオ基を含有する化合物（AM）と修飾前の細胞接着性ポリペプチドとを反応させる方法、並びに、アミノ基及び／又はアンモニオ基を含有する化合物（AM）を修飾前の細胞接着性ポリペプチドに物理吸着させる方法等が適用でき、その方法は、後述する細胞接着性ポリペプチド（P）と被覆材料（N）との結合方法のうち（1）～（3）と同様の化学的結合及び／又は物理吸着が使用でき、好ましい化学的結合及び／又は物理吸着も同様である。

【0039】

アミノ基及び／又はアンモニオ基を含有する化合物（AM）により修飾された細胞接着性ポリペプチドのアミノ基の平均個数（個）は、細胞接着性ポリペプチド（P）1分子あたり、100,000以下が好ましく、さらに好ましくは10,000以下、特に好ましくは1,000以下であり、また0.001以上が好ましく、さらに好ましくは0.01以上、特に好ましくは0.1以上である。

【0040】

上記アミノ基の平均個数は、公知の方法により定量でき、公知の方法としては、例えば、トリニトロベンゼンスルホン酸（TNBS）法〔タンパク質の化学IV（東京化学同人発行、1981年）等〕や塩酸・指示薬（ブロムフェノールブルー等）滴定法による全アミン価測定法〔JIS K7237-1986や、ASTM D2074-66等〕等が挙げられる。 10

具体的には、例えば、アミノ基の個数が既知のアミノ基及び／又はアンモニオ基を含有する化合物（AM）を、単位容積当たりの濃度を変化させてTNBS法によって測定し、検量線（アミノ基の個数と吸光度のグラフ）を作製する。また修飾前の細胞接着性ポリペプチド（P）をTNBS法で測定し、得られた吸光度を、検量線を用いてアミノ基の個数に換算する。同時に修飾後の細胞接着性ポリペプチドをTNBS法で測定し、得られた吸光度を、検量線を用いてアミノ基の個数に換算する。これら修飾前後のアミノ基の個数の差を算出して、その値を測定に用いた細胞接着性ポリペプチド（P）の分子数で除することで、細胞接着性ポリペプチド（P）に修飾されるアミノ基の平均個数とする。

【0041】

アミノ基及び／又はアンモニオ基を含有する化合物（AM）は、被覆材料（N）に結合されていてもよい。アミノ基及び／又はアンモニオ基を含有する化合物（AM）を被覆材料（N）に結合する方法としては、例えば、アミノ基及び／又はアンモニオ基を含有する化合物（AM）と被覆材料（N）とを反応させる方法、並びに、アミノ基及び／又はアンモニオ基を含有する化合物（AM）を被覆材料（N）に物理吸着させる方法等が適用でき、その方法は、後述する細胞接着性ポリペプチド（P）と被覆材料（N）との結合方法のうち、（1）～（3）と同様の化学的結合及び／又は物理吸着が使用でき、好ましい化学的結合及び／又は物理吸着も同様であり、また、定量方法も同様である。 20

【0042】

アミノ基及び／又はアンモニオ基を含有する化合物（AM）により修飾された被覆材料（N）のアミノ基の平均個数（個）は、本発明の創傷被覆材の単位面積あたり、 10^8 個/ cm^2 以上が好ましく、さらに好ましくは 10^{10} 個/ cm^2 以上、特に好ましくは 10^{12} 個/ cm^2 以上であり、また、 10^{22} 個/ cm^2 以下が好ましく、さらに好ましくは 10^{20} 個/ cm^2 以下、特に好ましくは 10^{18} 個/ cm^2 以下である。 30

【0043】

細胞接着性ポリペプチドは、蛋白質と同様にアミノ酸から構成されるため、微生物の栄養素となり、微生物の混入を受けやすい。また、細胞接着性ポリペプチドを遺伝子組み換え微生物で生産する場合には、微生物内に蓄積された細胞接着性ポリペプチドを精製・抽出するため、微生物由来物質が細胞接着性ポリペプチドに混入されやすい。従って、細胞接着性ポリペプチドへの微生物や微生物由来物質の混入は、創傷材料（N）よりも厳しく管理し防ぐ必要がある。微生物や微生物由来物質の混入の指標としては、有害物質自体である点でエンドトキシンが適当である。エンドトキシンは、菌体構成成分そのものに毒性のある細菌から死後遊離する毒素であり、糖蛋白質と脂質が連結した基本構造をもつ（遺伝子工学キーワードブック改訂第2版 株式会社羊土社発行 2000年）。 40

【0044】

本発明の細胞接着性ポリペプチド（P）中のエンドトキシンの含有量（EU/mg）は、細胞接着性ポリペプチド（P）の重量に基づいて、安全性の観点から、0.15未満が好ましく、さらに好ましくは0.015未満、特に好ましくは0.0015未満である。

【0045】

エンドトキシン含有量の測定方法としては、カプトガニの血球抽出液がエンドトキシンに 50

反応し、凝固することを利用したリムルステスト方法等が適用できる。市場から容易に入手できるリムルステスト用試薬キットとしては、商品名で示すと、例えば、リムルスFシングルテストワコー（和光純薬工業社製）及びリムルスES-2シングルテストワコー（和光純薬工業社製）等が挙げられる。試薬キットに用いる検体液の調製は、細胞接着性ポリペプチドを脱塩蒸留水（無菌）、エンドトキシン試験用水又は局方注射用水等のエンドトキシンが含有されない水に溶解することにより行われる。また、標準物質としては、日本薬局方で定められたエンドトキシン標準品、及びこのエンドトキシン標準品で検定された標準物質が使用できる。

【0046】

市販のリムルステスト試薬キットを用いたエンドトキシン含有量の測定方法としては、例えば、エンドトキシンの検出感度が 0.015 EU/mL のリムルステスト試薬キットを使用する場合、 1 mg の測定試料（細胞接着性ポリペプチド）をエンドトキシン試験用水の 1 mL に溶解した検体液（ 1 mg/mL ）の 0.2 mL をLAL試薬と混合し、水不溶性のゲルを形成するか否かを目視判定し、ゲルが形成されるとエンドトキシン含有量が 0.015 EU/mg 以上であると判定でき、ゲルが形成されていないとエンドトキシン含有量が 0.015 EU/mg 未満であると判定できる。また、 1 mg の測定試料に替えて 0.1 mg の測定試料を用いると（ 0.1 mg/mL の検体液）、同様に 0.15 EU/mg 以上又は未満含有しているかの判定ができる。また、同様に 10 mg の測定試料を用いること（ 10 mg/mL の検体液）により、 0.0015 EU/mg 以上又は未満含有しているかが判定できる。

【0047】

エンドトキシンは細菌の細胞壁等に含まれるため、細胞接着性ポリペプチドを細菌による遺伝子組み換え法で製造した場合や、細胞接着性ポリペプチドを無菌環境以外で取り扱った場合に、エンドトキシンが細胞接着性ポリペプチドに混入されることがある。このような場合、細胞接着性ポリペプチドに混入したエンドトキシンを除去する方法としては、例えば、エンドトキシン吸着アフィニティカラム、ゲル濾過カラム又は疎水性クロマトグラフィー用カラム等を用いてエンドトキシンを分離するカラム法、オートクレーブ又は乾熱滅菌器等を用いて熱によってエンドトキシンを失活させる加熱法、及び、これらの方法の組合せ等が適用できる。これらのうち、滅菌操作が簡便でエンドトキシンの除去が確実なのは、加熱法である。加熱温度としては、 40°C 以上が好ましく、さらに好ましくは 60°C 以上、特に好ましくは 80°C 以上であり、また、 500°C 以下が好ましく、さらに好ましくは 300°C 以下、特に好ましくは 200°C 以下である。加熱時間は、1秒以上が好ましく、さらに好ましくは10秒以上、特に好ましくは1分以上であり、また、500分以下が好ましく、さらに好ましくは50分以下、特に好ましくは10分以下である。これらのエンドトキシンを除去する方法は、細胞接着性天然ポリペプチド（P1）及び細胞接着性人工ポリペプチド（P2）に利用できる。

【0048】

本発明の被覆材料（N）は、細胞培養での使用時や創傷面への適用時に、培養液や創傷面に分散、溶解又は吸収され易い材料（以下、易生分解性材料（N1））、及び細胞培養での使用時や創傷面への適用時に、培養液や創傷面に分散、溶解又は吸収され難い材料（以下、難生分解性材料（N2））が使用できる。また易生分解性材料（N1）及び難生分解性材料（N2）を組み合わせ使用することもできる。これらの材料のうち、創傷面に適用する時に貼り替えが容易であり、取り扱いやすい点で、難生分解性材料（N2）が好ましい。なお、被覆材料（N）は、人体に重大な悪影響のある毒性物質を含むものは使用できない。

【0049】

易生分解性材料（N1）としては、天然高分子（N1A）、合成高分子（N1B）及び無機物（N1C）等が使用できる。

天然高分子（N1A）としては、例えば、コラーゲン、ゼラチン、グリコサミノグリカン、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、ケラタン硫酸、デルマトン硫酸、ヘパリン、エラ

スチン、キチン、キトサン、フィブリン、アルギン酸、デンプン、デキストラン、アルブミン、ポリヒドロキシ酪酸、ペクチン、ペクチン酸、ガラクトン、プルラン、アガロース、セルロース、グルテン及びフィブロイン等が挙げられる。

【0050】

合成高分子 (N1B) としては、例えば、乳酸、ロイシン、グリコール酸、 ϵ -カプロラクトン、ジオキサノン、リンゴ酸、ラクチド及びグリコリドからなる群より選ばれた単量体を必須単量体としてなる (共) 重合体 (ポリグリコール酸)、並びに、細胞接着シグナルを現わす最小アミノ酸配列 (X) を含まない合成ポリペプチド等が挙げられる。

【0051】

無機物 (N1C) としては、例えば、炭酸カルシウム及びリン酸カルシウム等が用いられる。炭酸カルシウムとしては、軽質炭酸カルシウム及び重質炭酸カルシウム等が挙げられる。リン酸カルシウムとしては、ヒドロキシアパタイト、トリカルシウムフォスフェート及びこれらと他のリン酸カルシウム (例えば、モノカルシウムハイドロジェンフォスフェート等) との混合物等が挙げられる。 10

【0052】

これらのうち、天然高分子 (N1A) 及び合成高分子 (N1B) が好ましく、さらに好ましくは合成高分子 (N1B)、特に好ましくは乳酸、ロイシン、グリコール酸、 ϵ -カプロラクトン、ジオキサノン、リンゴ酸、ラクチド及びグリコリドからなる群より選ばれた単量体を必須単量体としてなる (共) 重合体 (ポリグリコール酸) である。

【0053】

難生分解性材料 (N2) としては、天然高分子 (N2A)、合成高分子 (N2B) 及び無機物 (N2C) 等が使用できる。天然高分子 (N2A) としては、例えば、天然繊維 (綿、毛、麻及び絹等) 等が挙げられる。 20

【0054】

合成高分子 (N2B) としては、例えば、ポリオレフィン (ポリエチレン、ポリプロピレン及びこれらの変性物等)、オレフィン共重合体 (エチレン-ビニルアセテート共重合体、エチレン-エチル (メタ) アクリレート共重合体、エチレン-メチル (メタ) アクリレート共重合体及びエチレン- (メタ) アクリル酸共重合体等)、ポリウレタン、ポリエステル、ポリアクリル酸、ポリアミド、ポリ塩化ビニル、ポリ塩化ビニリデン、ポリスチレン、フッ素樹脂、シリコン樹脂、セルロース及び化学繊維 (ビスコースレイヨン、キュプラレーヨン、ポリノジック、アセテート、トリアセテート、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリアミド、ポリエステル、ポリアクリルニトリル、ビニロン、ポリ塩化ビニル、ビニリデン及びポリウレタン等) 等が用いられる。なお、(メタ) アクリレートは、アクリレート及び/又はメタクリレートを意味する。 30

【0055】

無機物 (N2C) としては、例えば、金属 (金、銀、プラチナ、チタン及びニッケル等) 及びセラミックス (アルミナ、ジルコニア及び窒化アルミニウム等) 等が用いられる。これらのうち、取扱性等の観点から、難生分解性材料 (N2) が好ましく、さらに好ましくは天然高分子 (N2A) 及び合成高分子 (N2B)、特に好ましくはポリオレフィン、ポリウレタン、ポリエステル及びポリアクリル酸、最も好ましくはポリウレタンである。 40

【0056】

被覆材料 (N) は、柔軟性、伸縮性、適度の水蒸気透過性、菌バリアー性及び滅菌性を総合的に考慮して選択されるものである。被覆材料 (N) の硬度は、取扱いが容易である点で、40以上が好ましく、さらに好ましくは50以上、特に好ましくは60以上であり、また100以下が好ましく、さらに好ましくは90以下、特に好ましくは80以下である。なお、硬度は、JIS K6301-1995、5.2スプリング式硬さ試験 (A形) に準拠して測定される。被覆材料 (N) の透湿度 (g/m^2 、24hr) は、滲出液の創傷における貯留量を適度に保つため、200以上が好ましく、さらに好ましくは400以上、特に好ましくは2000以上であり、また15000以下が好ましく、さらに好ましくは10000以下、特に好ましくは7000以下である。なお、透湿度は、JIS Z 50

0208-1976 (40℃、90%RH) に準拠して測定される。

【0057】

被覆材料 (N) の表面の水に対する接触角 (度) は、創傷治癒を促進させる観点より、15以上が好ましく、さらに好ましくは30以上、特に好ましくは50以上であり、また120以下が好ましく、さらに好ましくは110以下、特に好ましくは100以下である。なお、被覆材料 (N) の表面の水に対する接触角は、接触角計 (例えば、協和界面科学株式会社製、CA-S150型) 等を用いて測定することができる。測定条件としては、測定雰囲気温度: 25±1℃、測定雰囲気相対湿度: 65±5%、測定対象温度: 25±1℃、液滴の液量: 1.8±2μL、液滴の滴下針: 18G、接触角の読み取り: 滴下15±1秒後読み取りである。接触角の算出方法は、次式から算出される。

10

(接触角) = $2 \tan^{-1} \left\{ \frac{\text{(滴下後液滴の高さ)}}{\text{(滴下後液滴の半径)}} \right\}$

【0058】

被覆材料 (N) の表面の水に対する接触角は、被覆材料 (N) を表面処理してコントロールすることができ、例えば、官能基 (パーフルオロアルキル基、ポリオキシエチレン基、カルボキシル基、カルボニル基、水酸基及びアミノ基等) を付与するための化学的処理、表面に凹凸を作製するための物理的処理、蛋白質等のブロッキングによる吸着処理等が挙げられるが、これらのうち、化学的処理及び吸着処理が好ましく、さらに好ましくは化学的処理である。

【0059】

化学的処理としては、例えば、SG (Soil Guard) 加工やSR (Soil Release) 加工 (高分子薬剤入門、藤本武彦監修、三洋化成工業株式会社発行)、シランカップリング剤処理、オゾン処理、電子線処理、酸化剤処理、プラズマ処理、コロナ放電処理及びグロー放電処理等が利用できる。物理的処理としては、例えば、ダイヤモンドヤスリ (DT-101N) で表面を研磨する方法等が利用できる他に、被覆材料 (N) の成型時に所望の表面形状にすることができる。吸着処理としては、例えば、被覆材料 (N) を蛋白質含有溶液中に浸漬して蛋白質を吸着させる方法等が利用できる。蛋白質としては、アルブミン等の血清由来蛋白質及びカゼイン等の乳由来蛋白質等が挙げられる。

【0060】

被覆材料 (N) の形状としては、創傷 (褥瘡、潰瘍及び熱傷等) の治療に使用できれば特に制限はないが、例えば、シート状及び糸状等が挙げられ、これらのうち、細胞培養や創傷への適用での取り扱い易さの点から、シート状が好ましい。シートの厚さとしては、1μm以上が好ましく、さらに好ましくは5μm以上、特に好ましくは15μm以上、最も好ましくは30μm以上であり、また5cm以下が好ましく、さらに好ましくは1cm以下、特に好ましくは3mm以下、最も好ましくは500μm以下である。

30

【0061】

シート状の形態としては、例えば、フィルム、フォーム (スポンジ)、不織布、織布、編み布及びゲル状等が挙げられる。これらのうち、フィルム及びフォームが好ましく、さらに好ましくはフィルムである。

フィルムの目付量 (g/m^2) は、特に制限はないが、10以上が好ましく、さらに好ましくは20以上、特に好ましくは30以上であり、また150以下が好ましく、さらに好ましくは100以下、特に好ましくは75以下である。フォームの密度 (Kg/m^3) は、15以上が好ましく、さらに好ましくは40以上、特に好ましくは60以上であり、また500以下が好ましく、さらに好ましくは250以下、特に好ましくは150以下である。不織布、織物及び編み物の目付量 (g/m^2) は、特に制限はないが、20以上が好ましく、さらに好ましくは30以上、特に好ましくは50以上であり、また300以下が好ましく、さらに好ましくは200以下、特に好ましくは100以下である。

40

【0062】

なお、フィルム及びフォームには微細な孔を全面又は一部に有していてもよい。該孔の大きさは、空気及び水蒸気が容易に通過できる程度の大きさが好ましい。この穴の大きさとしては、孔の開孔面積 (mm^2) として、0.005以上が好ましく、さらに好ましくは

50

0.01以上、特に好ましくは0.05以上であり、また25以下が好ましく、さらに好ましくは10以下、特に好ましくは5以下である。またこの孔の形状は円形、楕円形、三角形、四角形、多角形、及び線上（スリット）等が挙げられるが、その目的とする滲出液の創傷における貯留量を適度に保てれば、いずれの形状を用いてもよい。

【0063】

本発明の創傷被覆材において、細胞接着性ポリペプチド（P）と被覆材料（N）は、通常、化学結合（イオン結合、水素結合及び／又は共有結合等）及び／又は物理吸着（ファンデルワールス力による吸着）によって複合化される。細胞接着性ポリペプチド（P）と被覆材料（N）が強固に結合される点で、化学結合が好ましく、さらに好ましくは共有結合である。

10

【0064】

細胞接着性ポリペプチド（P）と被覆材料（N）とを共有結合させる方法としては、例えば、（1）（P）のうち1級アミノ基又は2級アミノ基を有するもの（例えば、アルギニン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、スレオニン、トリプトファン、チロシン、バリン、アラニン、アスパラギン、アスパラギン酸、グルタミン、グルタミン酸、プロリン、システイン、リシン、セリン、グリシン、オルニチン、ヒスチジン、3-アミノプロピオン酸、8-アミノオクタン酸及び20-アミノエイコサン酸などを構成単位として含む細胞接着性ポリペプチド）と（N）のうちカルボキシル基を有するもの（例えば、ポリグリコール酸、細胞接着シグナルを現わす最小アミノ酸配列（X）を含まない合成ポリペプチド、ポリエチレン又はポリプロピレンの変性物、エチレン-（メタ）アクリル酸共重合体、ポリアクリル酸、コラーゲン、ゼラチン、グリコサミノグリカン、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、デルマトン硫酸、ヘパリン、エラスチン、フィブリン、アルギン酸、アルブミン、ペクチン、ペクチン酸、グルテン及びフィブロイン等の被覆材料）とを反応させる方法；（2）（P）のうち1級アミノ基又は2級アミノ基を有するものと（N）のうちヒドロキシル基を有するもの（例えば、ポリグリコール酸、エチレン-ビニルアセテート共重合体、ポリウレタン、ポリエステル、セルロース、化学繊維、コラーゲン、ゼラチン、グリコサミノグリカン、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、ケラタン硫酸、デルマトン硫酸、ヘパリン、エラスチン、キチン、キトサン、フィブリン、アルギン酸、デンプン、デキストラン、アルブミン、ポリヒドロキシ酪酸、ペクチン、ペクチン酸、ガラクトン、プルラン、アガロース、グルテン及びフィブロイン等の被覆材料）とを反応させる方法；（3）（P）のうちヒドロキシル基を有するもの（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸、セリン、トレオニン、チロシン、チロニン及びヒドロキシプリン等を構成単位として含む細胞接着性ポリペプチド）と（N）のうちカルボキシル基を有するものとを反応させる方法；（4）（P）のうちハロゲン原子を有するもの（例えば、アミノ基を有するハロゲン化物で修飾された細胞接着性ポリペプチド）と（N）のうちヒドロキシル基又はメルカプト基を有するもの（例えば、上記のヒドロキシル基を有するもの以外に、ヒドロキシル基の一部又は全部をメルカプト基に置き換えた構造を有する被覆材料）とを反応させる方法；及び、（5）（P）のうちビニル基を有するもの（例えば、アミノ基含有モノマーで修飾された細胞接着性ポリペプチド）と（N）のうちアミノ基、ヒドロキシル基又はカルボキシル基を有するものとを反応させる方法等が挙げられる。

20

30

40

【0065】

これらの反応は公知の方法（例えば、「ペプチド合成の基礎と実験、平成9年10月5日、丸善株式会社発行」に記載の方法等）で行うことができる。具体的には、以下の（1）～（6）の通りである。

（1）（P）のうち1級アミノ基又は2級アミノ基を有するものと（N）のうちカルボキシル基を有するものとを反応させる場合、（N）のカルボキシル基を予めカルボジイミド化合物と反応させ、アシルイソ尿素 $\{R'-N=C(OCOR)-NH-R'\}$ （-OCORが（N）に由来する部分）とした後、（P）のうち1級アミノ基又は2級アミノ基を有するものを加えることによって、（N）に（P）を、アミド結合を形成させて導入させ

50

ることができる。カルボジイミド化合物としては、例えばN, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド及び1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩等が挙げられる。

【0066】

(2) (P)のうち1級アミノ基又は2級アミノ基を有するものと(N)のうちヒドロキシル基を有するものとを反応させる場合、(N)のヒドロキシル基を予めカルボニルジイミダゾール化合物と反応させ、イミダゾール誘導体{R-Im、Imはイミダゾリン環、Rが(N)に由来}とした後、(P)のうち1級アミノ基又は2級アミノ基を有するものを加えることによって、(N)に(P)を、N-C結合を形成させて導入させることができる。カルボニルジイミダゾール化合物としては、例えばN, N'-カルボニルジイミダゾール等が挙げられる。 10

【0067】

(3) (P)のうちヒドロキシル基を有するものと(N)のうちカルボキシル基を有するものとを反応させる場合、(N)のカルボキシル基を予めカルボジイミド化合物と反応させ、アシルイソ尿素とした後、(P)のうちヒドロキシル基を有するものを加えることによって、(N)に(P)をエステル結合を形成させて導入させることができる。

【0068】

(4) (P)のうちハロゲン原子を有するものと(N)のうちヒドロキシル基又はメルカプト基を有するものとを反応させる場合、両者をアルカリ化合物の存在下又は非存在下に混合することによって、(N)に(P)を、エーテル結合又はチオエーテル結合を形成させて導入させることができる。アルカリ化合物としては、例えば無機アルカリ化合物(水酸化ナトリウム、水酸化カリウム及び水酸化リチウム等)及び有機アルカリ化合物(ジメチルアミノピリジン、アンモニア、トリエチルアミン、ナトリウムメトキシド及びDBU(サンアプロ社登録商標)等)等が挙げられる。 20

【0069】

(5) (P)のうちビニル基を有するものと、(N)のうちアミノ基、ヒドロキシル基又はカルボキシル基を有するものとを反応させる場合、両者をアルカリ化合物の存在下あるいは非存在下に混合し、マイケル付加させることによって、(N)に(P)を導入させることができる。

【0070】

細胞接着性ポリペプチド(P)を被覆材料(N)に、物理吸着、イオン結合及び/又は水素結合させる方法としては、例えば、溶媒等に(P)と(N)とを投入し、混合して作製する方法等が挙げられる。溶媒としては特に制限はないが、無機塩、有機酸塩、アミノ酸、ビタミン、アルコール、脂質・糖、酸及び/又は塩基を0.001~50重量%(好ましくは0.01~10重量%)含有する水溶液、水及び体液等が使用できる。 30

【0071】

無機塩としては、ハロゲン化金属塩、硫酸金属塩、リン酸金属塩、硝酸金属塩、炭酸金属塩及び過ハロゲン酸金属等が使用でき、例えば、塩化ナトリウム、硫酸ナトリウム、リン酸ナトリウム、塩化カルシウム、硝酸鉄、塩化カリウム、硫酸マグネシウム、炭酸ナトリウム、リン酸水素ナトリウム、リン酸カリウム、リン酸水素カリウム、硫酸銅、硫酸鉄、塩化リチウム、臭化ナトリウム、臭化リチウム、過塩素酸ナトリウム及び過塩素酸リチウム等が挙げられる。 40

有機酸塩としては、例えば、蟻酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、酢酸リチウム及び酒石酸ナトリウム等が挙げられる。

【0072】

アミノ酸としては、例えば、アルギニン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、スレオニン、トリプトファン、チロシン、バリン、アラニン、アスパラギン、アスパラギン酸、グルタミン酸、プロリン、セリン及びグリシン等が挙げられる。

ビタミンとしては、例えば、コリン、イノシトール、ニコチンアミド、グルタミン、ビタ 50

ミンA、ビタミンB₁、₂及びビタミンC等が挙げられる。

アルコールとしては、炭素数1～4のアルコール等が使用でき、例えば、メタノール、エタノール、イソプロピルアルコール及びブタノール等が挙げられる。

脂質・糖としては、例えば、脂質、単糖、2糖、オリゴ糖、アミノ糖及び酸性糖等が挙げられる。

【0073】

酸としては、無機酸及び炭素数1～6の有機酸等が使用でき、例えば、塩酸、磷酸、酢酸、蟻酸、フェノール及び硫酸等が挙げられる。

塩基としては、無機塩基及び炭素数2～6の有機塩基等が使用でき、例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、アンモニア及びトリエチルアミン等が挙げられる。

10

水としては、蒸留水、イオン交換水、水道水及びイオン交換蒸留水等が挙げられる。

体液としては、血液、血漿、血清及び尿等が挙げられる。

これらの溶媒の中で、無機塩、酸及び／又は塩基を含有する水溶液、並びに、水が好ましく、さらに好ましくは無機塩、酸及び／又は塩基を含有する水溶液である。

【0074】

本発明の創傷被覆材中の細胞接着性ポリペプチド(P)の含有量は、細胞接着性を向上させる観点より、創傷被覆材の単位面積あたり、 0.1 ng/cm^2 以上が好ましく、さらに好ましくは 1 ng/cm^2 以上、特に好ましくは 10 ng/cm^2 以上、最も好ましくは 100 ng/cm^2 以上であり、また、 100 mg/cm^2 以下が好ましく、さらに好ましくは 10 mg/cm^2 以下、特に好ましくは 1 mg/cm^2 以下、最も好ましくは $100 \mu\text{g/cm}^2$ 以下である。

20

単位面積あたりの細胞接着性ポリペプチド(P)の含有量の測定方法は特に限定されないが、例えば、免疫学的測定法が利用できる。具体的には、創傷被覆材の表面の一部(例えば、 $1 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$ の正形状)を切り取り、細胞接着性ポリペプチド(P)と結合する抗体に酵素を標識したもの(以下、酵素標識抗体1)を反応させ、この反応した酵素標識抗体1の酵素量を測定することにより、単位面積あたりの細胞接着性ポリペプチド(P)の含有量を測定することができる。

酵素標識抗体1は通常、酵素と特異抗体とを化学結合させたものであり、公知の方法で化学結合できる。例えば、酵素(例えば、ペルオキシダーゼ、 β -D-ガラクトシダーゼ、アルカリホスファターゼ及びグルコース-6-リン酸脱水素酵素等)と特異抗体とをグルタルアルデヒド法、過ヨウ素酸法、マレイミド法及びピリジルジスルフィド法等によって化学結合させる方法等(超高感度酵素免疫測定法、石川榮治著、株式会社学会出版センター、1993年；エンザイムイムノアッセイ、石川榮治訳、株式会社東京化学同人、1989年；及び酵素抗体法、渡辺慶一ら編、学際企画株式会社、1992年)が適用できる。また、特異抗体は細胞接着性ポリペプチド(P)に特異的に結合する抗体であり、公知の方法で作製できる。例えば、ポリクローナル抗体作製法及びモノクローナル抗体作製法(エンザイムイムノアッセイ、石川榮治訳、株式会社東京化学同人、1989年；及び酵素抗体法、渡辺慶一ら編、学際企画株式会社、1992年)等が適用できる。尚、特異抗体の交差反応性抗原に対する親和定数は小さいほど好ましく、例えば、特異抗体の細胞接着性ポリペプチド(P)への親和定数を1とした場合、交差反応性抗原に対する親和定数は、1以下が好ましく、さらに好ましくは0.1以下、特に好ましくは0.01以下である。これらの親和定数はエンザイムイムノアッセイ(石川榮治訳、株式会社東京化学同人、1989年)に記載の方法で得ることが出来る。

30

40

【0075】

本発明の創傷被覆材は、必要に応じて滅菌処理を施してもよい。滅菌方法としては、例えば、放射線滅菌、エチレンオキシドガス滅菌、プラズマ滅菌、 γ 線滅菌、アルコール滅菌、オートクレーブ滅菌、及び乾熱滅菌等が挙げられる。これらのうち、滅菌操作が簡便な点で、オートクレーブ滅菌及び乾熱滅菌が好ましい。

オートクレーブ滅菌及び乾熱滅菌する場合の加熱温度としては、 40°C 以上が好ましく、さらに好ましくは 60°C 以上、特に好ましくは 80°C 以上であり、また、 180°C 以下が

50

好ましく、さらに好ましくは160℃以下、特に好ましくは140℃以下である。
オートクレーブ滅菌及び乾熱滅菌する場合の加熱時間としては、1秒以上が好ましく、さらに好ましくは10秒以上、特に好ましくは1分以上であり、また、5000分以下が好ましく、さらに好ましくは500分以下、特に好ましくは100分以下である。
オートクレーブ滅菌する場合の槽内圧力としては、0.002MPa以上が好ましく、さらに好ましくは0.01MPa以上、特に好ましくは0.05MPa以上であり、また、5MPa以下が好ましく、さらに好ましくは1MPa以下、特に好ましくは0.2MPa以下である。

【0076】

本発明の創傷被覆材は、創傷治癒を促進させるため、細胞増殖因子（G1）及び／又は細胞増殖因子結合物質（G2）を含有させることが好ましい。

細胞増殖因子（G1）としては、細胞の増殖を促進する物質、例えば、線維芽細胞増殖因子、トランスフォーミング増殖因子、上皮細胞増殖因子、肝細胞増殖因子、血小板由来増殖因子、インシュリン様増殖因子、血管内皮細胞増殖因子、神経成長因子、幹細胞因子、白血病阻害因子、骨形成因子、ヘパリン結合上皮細胞増殖因子、神経栄養因子、結合組織成長因子、アンジオポエチン、コンドロモジュリン、テノモジュリン、インターフェロン、インターロイキン、腫瘍壊死因子、コロニー刺激因子、アドレナモジュリン及びナトリウム利尿ペプチド等の生理活性ポリペプチド等が用いられる（例えば、財団法人名古屋大学出版会発行「上田実編ティッシュエンジニアリング」（1999年）に記載）。

これらの細胞増殖因子（G1）の中で、適用できる組織細胞の範囲が広く、治療期間がより短縮できるという観点から、線維芽細胞増殖因子、トランスフォーミング増殖因子、上皮細胞増殖因子、肝細胞増殖因子、血小板由来増殖因子、インシュリン様増殖因子、血管内皮細胞増殖因子、骨形成因子、インターロイキン及び腫瘍壊死因子が好ましく、さらに好ましくは線維芽細胞増殖因子、上皮細胞増殖因子、インシュリン様増殖因子、血管内皮細胞増殖因子、インターロイキン及び腫瘍壊死因子である。

【0077】

細胞増殖因子結合物質（G2）としては、イオン結合等によって細胞増殖因子と結合可能な物質であり、例えば、ヘパリン、ヘパラン硫酸、コンドロイチン硫酸、デルマトン硫酸、ケラタン硫酸、ヒアルロン酸、ゼラチン、コラーゲン、ポリ乳酸、アガロース及びアルギン酸等が用いられる（例えば、財団法人名古屋大学出版会発行「上田実編ティッシュエンジニアリング」（1999年）や、株式会社羊土社発行「細胞接着のしくみと疾患」（1998年）に記載）。

なお、ヘパリン、ヘパラン硫酸、コンドロイチン硫酸、デルマトン硫酸、ケラタン硫酸、ヒアルロン酸、ゼラチン、コラーゲン、ポリ乳酸又はアルギン酸には、これらのアルカリ金属（リチウム、カリウム及びナトリウム等）塩、アルカリ土類金属（マグネシウム及びカルシウム等）塩又はアンモニウム塩を含む。

これらの細胞増殖因子結合物質の中で、適用できる組織細胞の範囲が広く、治療期間がより短縮できるという観点から、ヘパリン、ヘパラン硫酸、コンドロイチン硫酸、ヒアルロン酸及びゼラチンが好ましく、さらに好ましくは、ヘパリン、ヒアルロン酸及びゼラチンである。

【0078】

細胞増殖因子（G1）及び／又は細胞増殖因子結合物質（G2）は、通常、被覆材料（N）に結合された状態で存在する。その結合は、上記の細胞接着性ポリペプチド（P）と被覆材料（N）の結合と同様の化学結合及び／又は物理吸着が使用でき、好ましい化学結合及び／又は物理吸着も同様である。

【0079】

本発明の創傷被覆材中の細胞増殖因子（G1）及び／又は細胞増殖因子結合物質（G2）の含有量は、治療期間の短縮という観点から、本発明の創傷被覆材の単位面積あたり、0.01pg/cm²以上が好ましく、さらに好ましくは0.1pg/cm²以上、特に好ましくは1pg/cm²以上、最も好ましくは10pg/cm²以上であり、また、10

$0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 以下が好ましく、さらに好ましくは $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 以下、特に好ましくは $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 以下、最も好ましくは $0.1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 以下である。なお、細胞増殖因子 (G1) 及び細胞増殖因子結合物質 (G2) を含有する場合、これらの含有量比 (G1/G2) は、 0.00001 以上が好ましく、さらに好ましくは 0.0001 以上、特に好ましくは 0.001 以上、最も好ましくは 0.01 以上であり、また、 1000 以下が好ましく、さらに好ましくは 100 以下、特に好ましくは 10 以下、最も好ましくは 1 以下である。

単位面積あたりの細胞増殖因子 (G1) 及び/又は細胞増殖因子結合物質 (G2) の含有量の測定方法は特に限定されないが、例えば、免疫学的測定法が利用できる。具体的には、創傷被覆材の表面の一部 (例えば、 $1\text{cm} \times 1\text{cm}$ の正形状) を切り取り、(G1) 及び/又は (G2) と結合する抗体に酵素を標識したもの (以下、酵素標識抗体2) を反応させ、この反応した酵素標識抗体2の酵素量を測定することにより、単位面積あたりの (G1) 及び/又は (G2) の含有量を測定することができる。尚、酵素標識抗体2は上記の酵素標識抗体1と同様にして作製できる。

【実施例】

【0080】

以下に実施例を掲げて本発明を更に詳しく説明するが、本発明はこれら実施例のみに限定されるものではない。

<実施例1>

細胞接着性ポリペプチド [P2-1] の準備

特表平3-502935号公報中の実施例記載の方法に準じて、Arg Gly Asp配列と (Gly Ala Gly Ala Gly Ser)、配列 (40) とを各々約13個有し、数平均分子量約10万のペプチド "SLPF" を遺伝子組み換え大腸菌により製造し、カラムクロマトグラフィーにて精製して細胞接着性ポリペプチド [P2-0] を得た。さらに、この [P2-0] をオートクレーブ滅菌 (120°C 、20分) することにより、細胞接着性ポリペプチド [P2-1] を得た。

【0081】

難生分解性材料 [N2] の準備

水性ウレタン (商品名: パーマリンUA200、三洋化成工業株式会社製) の 6.67g とイオン交換水の 3.33g を混合し、ウレタン水溶液を調製した。このウレタン水溶液を、縦 $20\text{cm} \times$ 横 $20\text{cm} \times$ 高さ 1mm のポリプロピレンシート (株式会社メディカルエジェント製) 上に投入し、室温 (約 25°C) に放置した。室温放置24時間後に、順風乾燥機中で 120°C 、1時間乾燥した。乾燥後、ポリプロピレンシート上に形成されたウレタンフィルムを、ポリプロピレンシートから剥離し、難生分解性材料 [N2] を得た。

【0082】

創傷被覆材 [S1] の調製

細胞接着性ポリペプチド [P2-1] の 1mg を 4.5M 過塩素酸リチウム水溶液の 1mL に溶解し、さらに、 99.5% の塩化ナトリウムを 0.85 重量% で含有する 0.02M 、 $\text{pH} 7.2$ のリン酸緩衝液 (以下、PBS) で20倍希釈して、P2-1水溶液 ($50 \mu\text{g}/\text{mL}$) を作製した。このP2-1水溶液の 50mL と難生分解性材料 [N2] の $10\text{cm} \times 10\text{cm}$ とをガラスシャーレに投入し、 25°C で1時間静置させ、[N2] に [P2-1] を吸着させた。最後に、[P2-1] が吸着した [N2] を 100mL のイオン交換水で5回洗浄し、 37°C の順風乾燥機の中で12時間乾燥させ、創傷被覆材 [S1] を調製した。(P2-1の付着量 (含有量): $0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$)

【0083】

創傷被覆材 [S1] の細胞接着性ポリペプチド [P2-1] の付着量 (含有量) は、以下の手順で測定した。

(1) 細胞接着性ポリペプチド [P2-1] の付着量 (含有量) が既知の標準創傷被覆材 [H1] 及び付着量が未知の創傷被覆材 [S1] を各々 $1\text{cm} \times 1\text{cm}$ の正形状に切り

取り、牛血清アルブミンを1重量%で含有するPBSの3 mL中に1枚を投入し、室温（25℃）で2時間浸漬した。

尚、標準創傷被覆材の調製は、上記の創傷被覆材[S1]の調製と同様に行うが、付着量は、細胞接着性ポリペプチドが付着後のP2-1水溶液を濃縮、凍結乾燥して、未付着の細胞接着性ポリペプチド重量を求め、付着前の細胞接着性ポリペプチド重量から未付着の細胞接着性ポリペプチド重量を差し引くことにより求めた。

【0084】

(2) 各創傷被覆材を取り出し、ペルオキシダーゼ標識抗P2-1抗体を $10\mu\text{g/mL}$ 、牛血清アルブミンを1重量%及びTween20を0.2重量%で含有するPBSの2 mL中に各創傷被覆材1枚を投入し、37℃で2時間反応した。反応後、Tween20 10

を0.2重量%で含有するPBSの5 mLで各創傷被覆材を3回洗浄した。
尚、ペルオキシダーゼ標識抗P2-1抗体の調製は、ポリクローナル抗体作製法（エンザイムイムノアッセイ、石川榮治訳、株式会社東京化学同人、1989年）にしたがってウサギに細胞接着性ポリペプチド[P2-1]を免疫して抗P2-1抗体を得て、その抗P2-1抗体とペルオキシダーゼ（東洋紡績株式会社製）とをマレイミド法（エンザイムイムノアッセイ、石川榮治訳、株式会社東京化学同人、1989年）によって結合させることにより、ペルオキシダーゼ標識抗P2-1抗体を得た。

【0085】

(3) 各創傷被覆材を取り出し、OLYDAS専用試薬の発色液セット（三洋化成工業株式会社製）の0.2 mLとイオン交換水の1.8 mLとの混合液中に各創傷被覆材1枚を 20

投入し、37℃で1時間反応した。反応後、380 nmの波長で吸光度測定した。
(4) 標準創傷被覆材[H1]の吸光度を用いて検量線を作成し、その検量線から、創傷被覆材[S1]の付着量を得た。以下、同様にしてポリペプチドの付着量を測定した。

【0086】

<実施例2>

創傷被覆材[S2]の調製

1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩（シグマ社製）の0.479 gを50 mLのイオン交換水に溶解し、カルボジイミド水溶液を作製した。このカルボジイミド水溶液の50 mLと難生分解性材料[N2]の $10\text{cm} \times 10\text{cm}$ とをガラスシャーレに投入し、25℃で1時間静置した。その後、100 mLのイオン交換 30

水で5回洗浄した。次に、P2-1水溶液の50 mLを投入し、25℃で1時間静置させ、[N2]に[P2-1]を結合させた。最後に、[P2-1]が結合した[N2]を100 mLのイオン交換水で5回洗浄し、37℃の順風乾燥機の中で12時間乾燥させ、創傷被覆材[S2]を調製した。（P2-1の付着量（含有量）： $1\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ）

【0087】

<実施例3>

創傷被覆材[S3]の調製

1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩（シグマ社製）の0.479 gを50 mLのイオン交換水に溶解し、カルボジイミド水溶液を作製した。このカルボジイミド水溶液の50 mLと難生分解性材料[N2]の $10\text{cm} \times 10\text{cm}$ と 40

をガラスシャーレに投入し、25℃で1時間静置した。その後、100 mLのイオン交換水で5回洗浄した。次に、P2-1水溶液の50 mLを投入し、25℃で1時間静置させ、[N2]に[P2-1]を結合させた。その後、100 mLのイオン交換水で5回洗浄した。さらに、細胞増殖因子(G1)である線維芽細胞増殖因子（ベクトンディッキンソン社製）[G1-1]を 50ng/mL で含む細胞増殖因子含有水溶液[GS11] 50 mLを投入し、25℃で1時間静置させ、[N2]に[G1-1]を結合させた。その後、100 mLのイオン交換水で5回洗浄し、創傷被覆材[S3]を調製した。（P2-1の付着量： $1\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ）

【0088】

<実施例4>

創傷被覆材「S4」の調製

実施例3の細胞増殖因子含有水溶液[G S 1 1]の代わりに、細胞増殖因子(G 1)であるインターロイキン2(ベクトンディッキンソン社製)[G 1-2]を5 ng/mLで含む細胞増殖因子含有水溶液[G S 1 2]を使用し、実施例3と同様にして、創傷被覆材[S 4]を調製した。(P 2-1の付着量: 1 μ g/cm²)

【0089】

<実施例5>

創傷被覆材「S5」の調製

実施例3の細胞増殖因子含有水溶液[G S 1 1]の代わりに、細胞増殖因子結合物質(G 2)であるヘパリンナトリウム(ナカライテスク株式会社製)[G 2-1]を50 ng/mLで含む細胞増殖因子結合物質含有水溶液[G S 2 1]を使用し、実施例3と同様にして、創傷被覆材[S 5]を調製した。(P 2-1の付着量: 1 μ g/cm²)

【0090】

<実施例6>

創傷被覆材「S6」の調製

実施例3の細胞増殖因子含有水溶液[G S 1 1]の代わりに、細胞増殖因子結合物質であるヒアルロン酸[G 2-2](ICNバイオメディカル社製)を50 ng/mLで含む細胞増殖因子結合物質含有水溶液[G S 2 2]を使用し、実施例3と同様にして、創傷被覆材[S 6]を調製した。(P 2-1の付着量: 1 μ g/cm²)

【0091】

<実施例7>

細胞接着性ポリペプチド「P 2-2」の準備

N, N'-カルボニルジイミダゾール(和光純薬株式会社製)の0.096 gをジメチルスルフォキシド5 mLに溶解したものに、実施例1で得られた細胞接着性ポリペプチド[P 2-1]10 mgを投入し、37℃で10分間反応させた。

次にエチレンジアミン0.107 gを加え、37℃で20時間反応させた。反応後、透析チューブに投入し、1 Lのイオン交換水で2時間の透析を5回行い、細胞接着性ポリペプチド[P 2-2]を得た。(P 2-2の修飾されたアミノ基の個数: 60個/分子)

【0092】

尚、P 2-2の修飾されたアミノ基の個数は、以下の手順で測定した。

(1) L-リジンの0 mg, 10 mg, 30 mg, 100 mgを0.6 M, pH 9.5の炭酸緩衝液(以下、CB)の1 Lに各々溶解して標準系列とした。またP 2-1およびP 2-2の1 mgをCBの1 mLに各々溶解して、それぞれ検体液1、検体液2とした。

(2) ガラス試験管中に標準系列、検体液1及び検体液2を各々100 μ L/試験管で投入し、さらに2, 4, 6-トリニトロベンゼンスルホン酸ナトリウム(TNBS)を7.2 mg重量%で含む水溶液を20 μ L/試験管で加えて攪拌し、室温(25℃)で2時間放置した。

(3) 2時間後、イオン交換水を1 mL/試験管で加え、367 nmで吸光度測定した。

(4) 標準系列の吸光度とアミノ基の個数と検量線を作成し、その検量線から、検体液1及び検体液2のアミノ基の個数を算出し、検体液2の個数から検体液1の個数を差し引くことで、修飾されたアミノ基の個数とした。以下同様にしてアミノ基の個数を定量した。

【0093】

創傷被覆材「S7」の調製

実施例2のP 2-1水溶液の代わりに、細胞接着性ポリペプチド[P 2-2]を50 μ g/mLで含むPBS(P 2-2水溶液)を使用し、実施例2と同様にして創傷被覆材[S 7]を調製した。(P 2-2の付着量: 1 μ g/cm²)

【0094】

<実施例8>

創傷被覆材「S11」の調製

実施例3の細胞増殖因子含有水溶液[G S 1 1]の代わりに、ポリエチレンイミン(和光

純薬工業株式会社製)を $100\mu\text{g}/\text{mL}$ で含むポリエチレンジイミン水溶液 [GS13] を使用し、実施例3と同様にして、創傷被覆材 [S11] を調製した。(P2-1の付着量: $1\mu\text{g}/\text{cm}^2$)

【0095】

<実施例9>

細胞接着性ポリペプチド [P2-3] の準備

N, N'-カルボニルジイミダゾール (和光純薬株式会社製) の 0.096g をジメチルスルフォキシド 5mL に溶解したものに、実施例1で得られた細胞接着性ポリペプチド [P2-1] 10mg を投入し、 37°C で 10 分間反応させた。次にポリエチレンジイミン 0.357g を加え、 37°C で 20 時間反応させた。反応後、透析チューブに投入し、 1L のイオン交換水で 2 時間の透析を 5 回行い、細胞接着性ポリペプチド [P2-3] を得た。(P2-3の修飾されたアミノ基の個数: 3 個/分子)

【0096】

創傷被覆材 [S12] の調製

実施例2のP2-1水溶液の代わりに、細胞接着性ポリペプチド [P2-3] を $100\mu\text{g}/\text{mL}$ で含むPBS (P2-3水溶液) を使用し、実施例2と同様にして創傷被覆材 [S12] を調製した。(P2-3の付着量: $1\mu\text{g}/\text{cm}^2$)

【0097】

<比較例1>

創傷被覆材 [S8] の調製

実施例1の難生分解性材料 [N2] を、そのまま創傷被覆材 [S8] とした。

【0098】

<比較例2>

創傷被覆材 [S9] の調製

コラーゲンフィルム (株式会社高研製、厚さ約 1mm) を、そのまま創傷被覆材 [S9] とした。

【0099】

<比較例3>

創傷被覆材 [S10] の調製

実施例1の「創傷被覆材 [S1] の調製」において、細胞接着性ポリペプチド [P2-0] のオートクレーブ滅菌を省略する以外は、実施例1と同様にして調製し、創傷被覆材 [S10] を調製した。

【0100】

<評価1 (エンドトキシン濃度)>

細胞接着性ポリペプチド [P2-0]、細胞接着性ポリペプチド [P2-1]、細胞接着性ポリペプチド [P2-2] 及び細胞接着性ポリペプチド [P2-3] を、エンドトキシン含有量測定用の測定試料とした。この測定試料の各々について、 1mg 及び 0.1mg を脱塩蒸留水 (無菌) (和光純薬工業株式会社製) 1mL に投入して、 $1\text{mg}/\text{mL}$ 及び $0.1\text{mg}/\text{mL}$ の検体液を調製した。また測定キットとして、エンドトキシンの検出感度が $0.015\text{EU}/\text{mL}$ のリムルスES-2シングルテストワコー (和光純薬工業社製) を用い、測定キットの使用説明書に従って検体液を測定した。

【0101】

<評価結果1>

細胞接着性ポリペプチド [P2-0] は、 $1\text{mg}/\text{mL}$ 及び $0.1\text{mg}/\text{mL}$ の検体液の両方ともゲルが形成され (エンドトキシン陽性)、測定試料のエンドトキシン含有量は、 $0.015\text{EU}/0.1\text{mg}$ 以上、即ち $0.15\text{EU}/\text{mg}$ 以上であった。

細胞接着性ポリペプチド [P2-1]、[P2-2] 及び [P2-3] は、 $1\text{mg}/\text{mL}$ 及び $0.1\text{mg}/\text{mL}$ の検体液の両方ともゲルが形成されず (エンドトキシン陰性)、測定試料のエンドトキシン含有量は、 $0.015\text{EU}/\text{mg}$ 未満であった。

【0102】

<評価2（細胞培養A）>

実施例1～7、比較例1～3の創傷被覆材〔S1〕～〔S10〕を各々1cm×1cmの大きさに切り取ったものを、24穴ポリスチレンプレート（ベクトンディッキンソン社製）の底面に1枚／穴で投入し、創傷被覆材の四隅をビニールテープで底面に貼付した後に、クリーンベンチ中でUV照射を8時間行い、滅菌した。なお、1種類の創傷被覆材につき、4穴分を使用し、4穴分同じ操作を行った。以下同様である。

次に、正常ヒト皮膚線維芽細胞増殖用低血清培地（倉敷紡績株式会社製）1mL及び正常ヒト皮膚線維芽細胞（倉敷紡績株式会社製）2万個を、24穴ポリスチレンプレート1穴に投入して、37℃、CO₂濃度5容量%のインキュベーター中にて3日間の細胞培養を行った。

培養3日後に、創傷被覆材〔S1〕～〔S10〕をプレートの底面から各々剥がし、新しい24穴ポリスチレンプレートの底面に創傷被覆材〔S1〕～〔S10〕を1枚／穴で投入し、さらに0.25重量／容量%のトリプシン溶液（100mL中に0.25gのトリプシンが溶解されている溶液、商品名：Trypsin-EDTA、インビトロジェン株式会社製）を200μL／穴で投入して、25℃で3分間放置した。

3分後に、牛胎児血清（ギブコBRL社製）を20μL／穴で投入し、ピペットで吸排することで混合液にした。その混合液の20μL、NaClを0.85重量%で含有するリン酸緩衝液（0.02M, pH7.2）の30μL及びテトラカラーワン（生化学工業社製）の10μLを、96穴ポリスチレンプレート（ベクトンディッキンソン社製）の1穴に投入し、37℃、CO₂濃度5容量%のインキュベーター中にて4時間放置した。

4時間後に、ホルマザン生成量を492nm（対照波長630nm）の吸光度で分光光度計を用いて測定し、この値を細胞活性とした。細胞活性は、当該吸光度の高さに比例する。これらの結果を表1に示す（これらの結果は各々4穴分の平均データである。）。なお、テトラカラーワンのテトラゾリウム塩が細胞内ミトコンドリアのデヒドロゲナーゼにより還元されて、ホルマザンを生成することにより発色する。また、比較例2の創傷被覆材〔S9〕は、培養3日後に創傷被覆材をプレートの底面から剥がすことが形状の崩壊によりできず、細胞活性は測定できなかった。

【0103】

【表1】

	創傷被覆材	細胞活性 (λ=492nmの吸光度)
実施例1	創傷被覆材〔S1〕	0.21
実施例2	創傷被覆材〔S2〕	0.3
実施例3	創傷被覆材〔S3〕	0.44
実施例4	創傷被覆材〔S4〕	0.33
実施例5	創傷被覆材〔S5〕	0.37
実施例6	創傷被覆材〔S6〕	0.37
実施例7	創傷被覆材〔S7〕	0.4
比較例1	創傷被覆材〔S8〕	0.14
比較例2	創傷被覆材〔S9〕	測定不能
比較例3	創傷被覆材〔S10〕	0.18

【0104】

表1の結果から、本発明の創傷被覆材S1～S7は、比較例の創傷被覆材S8～S10に比べて、創傷被覆材に接着される細胞の細胞活性が極めて高いことが判る。また、本発明の創傷被覆材は、比較例2のような形状の崩壊は生じなかった。

【0105】

<評価3（細胞培養B）>

実施例2、8、9、比較例1の創傷被覆材[S2]、[S11]、[S12]、[S8]の各々を直径1cm²の大きさに切り取り、クリーンベンチ中でUV照射を8時間行って滅菌した。

一方で、三次元培養組織構築キットのPreTissue-Dermal（東洋紡績株式会社製）を用いて本キットの取扱説明書にしたがって、培養真皮を作製した。作製後、本キットで使用されている血清培地を無血清培地であるDMEM培地（ICN Biomedicals社製）へ培地交換して、無血清環境下の培養真皮とした。

この培養真皮の上面に、上記の創傷被覆材[S2]、[S11]、[S12]、[S8]を被せ37℃、CO₂濃度5容量%のインキュベーター中にて5日間の細胞培養を行った。培養5日後に、創傷被覆材[S2]、[S11]、[S12]、[S8]を培養真皮の上面から各々剥がし、新しい24穴ポリスチレンプレートの底面に創傷被覆材[S2]、[S11]、[S12]、[S8]を1枚/穴で投入し、さらにPBSを125μL/穴およびテトラカラーワン（生化学工業社製）を25μL/穴で投入し、37℃、CO₂濃度5容量%のインキュベーター中にて4時間放置した。4時間後に、ホルマジン生成量を492nm（対照波長630nm）の吸光度で分光光度計を用いて測定し、この値を細胞活性2とした。細胞活性2は、当該吸光度の高さに比例する。これらの結果を表2に示す（これらの結果は各々4穴分の平均データである。）。

【0106】

【表2】

	創傷被覆材	細胞活性2 (λ=492nmの吸光度)
実施例2	創傷被覆材[S2]	0.050
実施例8	創傷被覆材[S11]	0.117
実施例9	創傷被覆材[S12]	0.071
比較例1	創傷被覆材[S8]	0.039

【0107】

表2の結果から、本発明の創傷被覆材S2、S11、S12は、比較例の創傷被覆材S8に比べて、培養真皮から創傷被覆材に遊走される細胞の細胞活性が極めて高いことが判る。

【0108】

<評価4（動物実験A）>

DMマウス（C57BLK Jcl db/db、日本クレア株式会社製）に対し、ジエチルエーテルによる吸気麻酔を実施し、フェザー剃刀を用いて背部全面を剃毛し、その中央部に円形（直径1cm）の全層皮膚欠損創を作製した。なお、DMマウスは、糖尿病確認ストリップ（ウロピース、藤沢薬品工業株式会社製）を用いて、糖尿病発症が確認されているものを使用した。

実施例2の創傷被覆材[S2]、比較例1の創傷被覆材[S8]及び比較例2の創傷被覆材[S9]を各々2cm×2cmの大きさに切り取ったものを、粘着フィルム（商品名：マルチフィックス、アルケア株式会社製）に貼り合わせ、創傷被覆材側が該創面に当たるように貼り付けし、さらに創面との密着性を上げるための脱脂綿を重ね、粘着性バンデージ（商品名：シルキーテックス、アルケア株式会社製）で体幹部全周を巻き付け、固定した。

生育環境は室温24℃、飼料、給水ともに自由摂取状態とした。観察点は14日目として、14日目に創傷治療材料を創面から取り外し、対象となる再生組織を含む創傷全体を再生組織下に存在する筋層を含め実験動物より採取し、固定、パラフィン包埋処理を実施し

、組織切片を作製した。作製された組織切片をヘマトキシリン・エオジン染色（H-E染色）処理し、再生組織を評価した。この再生組織の写真を図1（創傷被覆材[S2]）及び図2（創傷被覆材[S8]）に示す。

なお、肉眼所見において、創傷被覆材[S2]及び創傷被覆材[S8]を用いた創面には感染が生じていなかったが、創傷被覆材[S9]を用いた創面には感染が生じていた。また、創傷被覆材[S9]は組織との癒合により組織採取が不可能であった。

図1より、実施例2の本発明の創傷被覆材[S2]を用いたものは、再生組織、細胞浸潤が多く見られ、再生組織内のマトリックス産生を多量に認める良好な再生状態と言える。図2より、比較例1の創傷被覆材[S8]を用いたものは、再生組織及び細胞浸潤が乏しく、再生状態は不良と言える。

10

【0109】

<評価5（動物実験B）>

（1）実施例8の創傷被覆材[S11]の適用

創傷被覆材[S2]、[S8]及び[S9]に代えて、実施例8で調製した創傷被覆材[S11]を用い、全層皮膚欠損創の大きさを直径1cmから直径1.4cmに変更したこと及び粘着フィルムをジョンソン&ジョンソン社製のバイオクルーシブ（商品名）に変更したこと以外は、評価4（動物実験A）と同様にして、DMマウスを生育して創傷治療の動物実験を開始した。なお開始後3日目に創傷被覆材を創面から取り外し、再度、粘着フィルムと共に創傷被覆材[S11]を適用した。

（2）比較例1の創傷被覆材[S8]およびトラフェルミン溶液の適用：

医薬品の褥瘡・皮膚潰瘍治療剤であるフィブラストスプレー250（科研製薬株式会社製）の250 μ gを2.5mLの生理食塩水に溶解し、100 μ g/mLのトラフェルミン溶液を調製した。

20

創傷被覆材[S11]に代えて、比較例1で調製した創傷被覆材[S8]を用い、創傷被覆材を粘着フィルムと共に張り合わせる前に、トラフェルミン溶液の0.2mL（トラフェルミン20 μ gに相当）を上記の全層皮膚欠損創にピペットで滴下すること以外は、上記（1）と同様にして、DMマウスを育成し創傷治療の動物実験を開始した。

なお開始後3日目に創傷被覆材を創面から取り外した後、トラフェルミン溶液0.2mLを欠損創に滴下し、再度、粘着フィルムと共に創傷被覆材[S8]を適用した。

（3）創傷治療状態の観察

30

観察日は7日目および14日目として、観察日に創傷被覆材を創面から取り外し、創面の肉眼観察を行った。その写真を図3（7日目、創傷被覆材[S11]）、図4（7日目、創傷被覆材[S8]およびトラフェルミン溶液）、図5（14日目、創傷被覆材[S11]）及び図6（14日目、創傷被覆材[S8]およびトラフェルミン溶液）に示す。

7日目の結果として、実施例8の本発明の創傷被覆材[S11]を用いたものは、創縁全周囲からの表皮形成が認められた（図3）。一方比較例1の創傷被覆材[S8]およびトラフェルミン溶液を用いたものは、表皮形成が認められなかった（図4）。

14日目の結果として、実施例8の本発明の創傷被覆材[S11]を用いたものは、創面全体に表皮形成が認められた（図5）。一方、比較例1の創傷被覆材[S8]およびトラフェルミン溶液を用いたものは、創面の一部には表皮形成が認められたが創面全体には表皮形成が認められなかった（図6）。

40

【産業上の利用可能性】

【0110】

本発明の創傷被覆材は、創縁部等に含まれる細胞や創傷より滲出する滲出液等に含まれる細胞が本発明の創傷被覆材に接着することにより、良好な創傷治療効果を発揮する。特に表皮形成の点では驚異的な効果を示す。

本発明の創傷被覆材に接着可能な細胞としては、ヒト由来の細胞が適しており、例えば、皮膚に関与する細胞（上皮細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞及び平滑筋細胞等）、血管に関与する細胞（血管内皮細胞、平滑筋細胞及び線維芽細胞等）、筋肉に関与する細胞（筋肉細胞等）、脂肪に関与する細胞（脂肪細胞等）、神経に関与する細胞（神経細胞等）、

50

肝臓に關与する細胞（肝實質細胞等）、膵臓に關与する細胞（膵ラ島細胞等）、腎臓に關与する細胞（腎上皮細胞、近位尿細管上皮細胞及びメサングウム細胞等）、肺・気管支に關与する細胞（上皮細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞及び平滑筋細胞等）、目に關与する細胞（視細胞、角膜上皮細胞及び角膜内皮細胞等）、前立腺に關与する細胞（上皮細胞、間質細胞及び平滑筋細胞等）、骨に關与する細胞（骨芽細胞、骨細胞及び破骨細胞等）、軟骨に關与する細胞（軟骨芽細胞及び軟骨細胞等）、齒に關与する細胞（齒根膜細胞及び骨芽細胞等）、血液に關与する細胞（白血球及び赤血球等）、及び幹細胞（例えば、骨髓未分化間葉系幹細胞、骨格筋幹細胞、造血系幹細胞、神經幹細胞、肝幹細胞（oval cell、small hepatocyte等）、脂肪組織幹細胞、胚性幹（ES）細胞、表皮幹細胞、腸管幹細胞、精子幹細胞、胚生殖幹（EG）細胞、膵臓幹細胞（膵管上皮幹細胞等）、白血球系幹細胞、リンパ球系幹細胞、角膜系幹細胞、前駆細胞（脂肪前駆細胞、血管内皮前駆細胞、軟骨前駆細胞、リンパ球系前駆細胞、NK前駆細胞等）等）等が挙げられる。

【0111】

本發明の創傷被覆材の創傷面への適用としては、創傷面に被覆できれば制限なく適用でき、例えば、接着剤若しくは粘着剤付きのカバー、包帯、伸縮自在メッシュ又は眼帯等を用いて固定してもよく、縫合又は接着してもよい。また、創傷が潰瘍等の慢性創傷の場合、黄色期から赤色期の創傷への適用が好ましく、また創傷が熱傷や外傷性皮膚欠損症等の急性創傷の場合、炎症期から肉芽形成期の創傷への適用が好ましい。

さらに、本發明の創傷被覆材は、上記の細胞を体外で培養するための基材としても適用できる。

【図面の簡単な説明】

【0112】

【図1】実施例2で得た本發明の創傷被覆材[S2]を用いた＜評価4（動物実験A）＞における組織切片の顕微鏡写真（倍率45倍）である。

【図2】比較例1で得た比較用の創傷被覆材[S8]を用いた＜評価4（動物実験A）＞における組織切片の顕微鏡写真（倍率45倍）である。

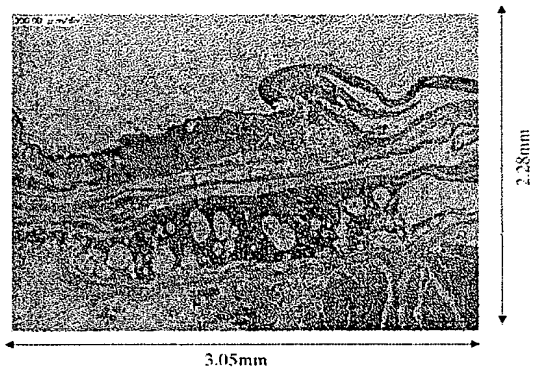
【図3】実施例8で得た本發明の創傷被覆材[S11]を用いた＜評価5（動物実験B）＞における7日目の創面の写真（倍率3倍）である。

【図4】比較例1で得た比較用の創傷被覆材[S8]を用いた＜評価5（動物実験B）＞における7日目の創面の写真（倍率3倍）である。

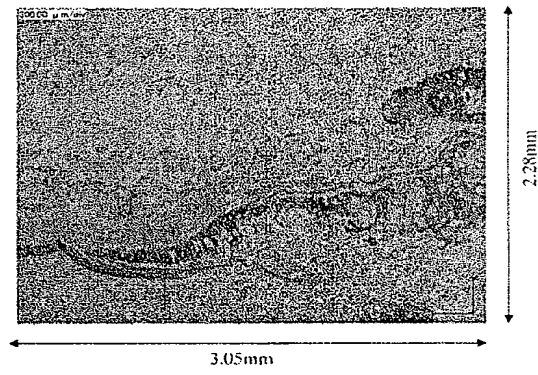
【図5】実施例8で得た本發明の創傷被覆材[S11]を用いた＜評価5（動物実験B）＞における14日目の創面の写真（倍率3倍）である。

【図6】比較例1で得た比較用の創傷被覆材[S8]を用いた＜評価5（動物実験B）＞における14日目の創面の写真（倍率3倍）である。

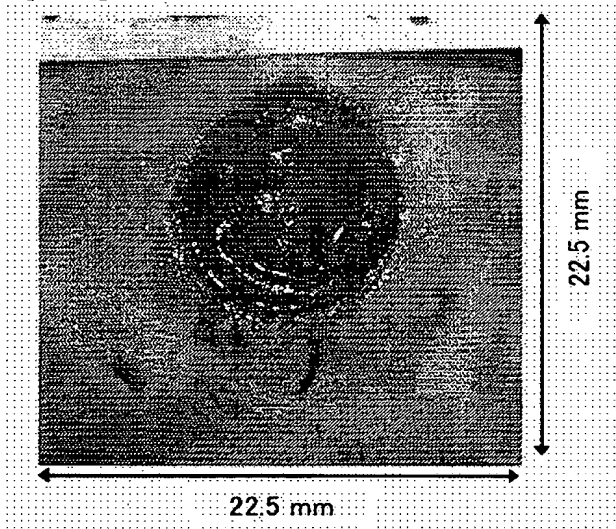
【図 1】



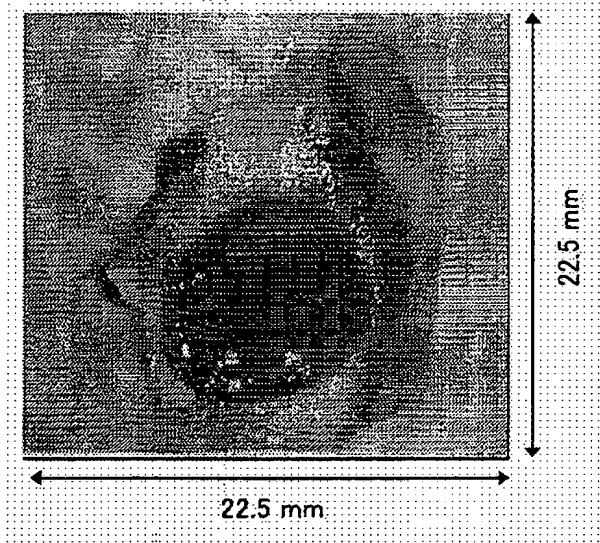
【図 2】



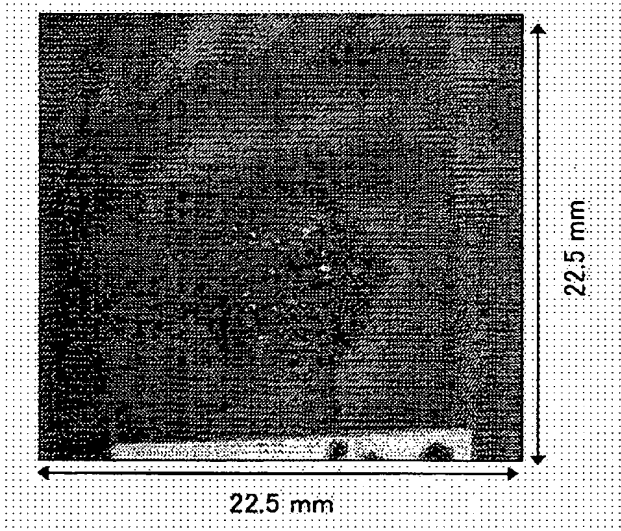
【図 3】



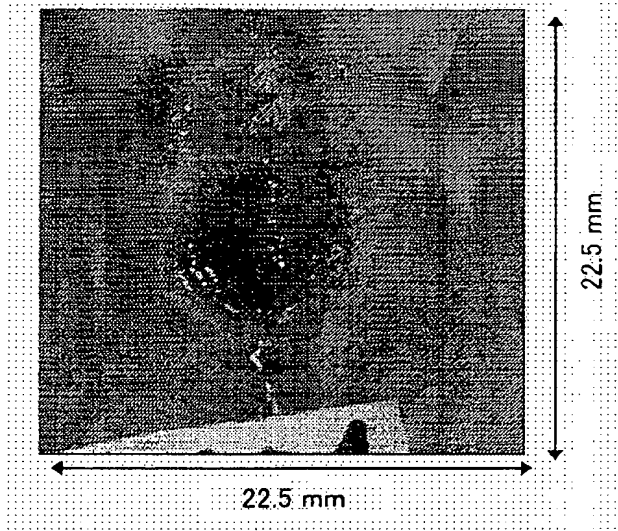
【図 4】



【図 5】



【図 6】



【配列表】
2004049921000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 中村 博昭

東京都墨田区京島1丁目21番10号 アルケア株式会社内

Fターム(参考) 4C081 AA01 AA12 BA12 BA14 CA211 CD112 CD172 CD29 DA02 DB07
DC05 EA02